

MÔNICA FRIGHETTO

**MEDIADORES ENVOLVIDOS NA NOCICEPÇÃO,  
HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELA  
ENDOTELINA-1 EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis/SC

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**MEDIADORES ENVOLVIDOS NA NOCICEPÇÃO,  
HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELA  
ENDOTELINA-1 EM CAMUNDONGOS**

MÔNICA FRIGHETTO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae**

Florianópolis/SC, 10 de março de 2004.

FRIGHETTO, Mônica. **Mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema causados pela endotelina-1 em camundongos.** Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós - Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Giles Alexander Rae

Defesa: 10/03/2004

O presente estudo investigou os mecanismos celulares e mediadores envolvidos nas respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica, induzidas pela injeção intraplantar (*i.pl.*) de endotelina-1 (ET-1) em camundongos. O degranulador de mastócitos, composto 48/80, injetado localmente, induz *per se* respostas similares às aquelas induzidas pela ET-1. Injeções diárias e locais desta substância, inibe tanto as respostas à ET-1 quando às induzidas pelo próprio composto 48/80 administrado por via *i.pl.* O antagonista de receptores ET<sub>A</sub>, BQ-123, reduz a hiperalgesia induzida pelo composto 48/80. Além disso, a pirilamina e a dexametasona inibem as três respostas à ET-1, enquanto a metisergida tem um efeito inibitório à hiperalgesia. A naltrexona tem a capacidade de desmascarar um efeito hiperalgésico que não aparecia quando a ET-1 era administrada *i.pl.* em doses mais elevadas. Em combinação, estes resultados sugerem que células inflamatórias como os mastócitos, mas não neutrófilos, são fundamentais à indução de respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica à injeção *i.pl.* de ET-1. A histamina parece estar envolvida nos três efeitos, enquanto a serotonina e as ETs endógenas participam da resposta hiperalgésica à estímulo químico. Porém, outros mediadores como c PAF, eicosanóides, leucotrieno B<sub>4</sub>, NO, bradicinina não parecem mediar estas respostas. Além disso, os opióides podem estar envolvidos na ação antinociceptiva induzida pela estimulação de receptores ET<sub>B</sub> por doses mais elevadas do peptídeo.

Palavras-chave: [endotelinas}, [nocicepção], [mastócitos], [opióides].

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina com o apoio financeiro do CNPq.

"Para achar água é preciso descer terra adentro,  
encharcar-se no lodo. Mas há os que preferem  
olhar os céus e esperar pelas chuvas"

Oduvaldo Vianna Filho  
(em Cúmplice da Paixão)

*A Deus  
pela vida, amor e confiança.*

*Aos meus pai, Eloni e Velci Frighetto  
pela vida, confiança e apoio em todos  
os momentos de minha vida;*

*Ao meu irmão Maurício pela amizade  
e companherismo, inclusive de  
apartamento;*

*A meu irmãozinho e “gatinho” Marcus  
Giovani pela alegria que representa  
para a toda família;*

*Ao meu noivo Jaisson Bordignon que  
sempre esteve comigo. Agradeço-lhe  
nelo amor, respeito e amizade*

## Agradecimentos

- ✓ *Aos meus avós pela eterna paciência, amor, dedicação;*
- ✓ *A toda minha grande família por tudo (não coloquei os nomes porque não caberia!); especialmente à Dinda, à Nicinha, à tia Rita, à tia Eleni, às madrinhas Viane e Elaine, pelo grande incentivo e carinho;*
- ✓ *Ao meu orientador Giles Alexander Rae pelo apoio e compreensão;*
- ✓ *Aos colegas de Laboratório, Janice, Emerson, Juliana, Fernanda, Patrícia, Cláudio e Anna pela amizade, ajuda e companheirismo. Especialmente à Anna pela paciência e auxílio principalmente no período da Iniciação Científica;*
- ✓ *Aos meus amigos Sueli, Jackie (e família), Marcílio, Alessandra, Karina, Simone, Sílvia, Regina, Pati, especialmente à Marlene pela amizade, carinho e ajuda nos momentos mais inconstantes;*
- ✓ *A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial ao Prof. Calixto pelo empréstimo do laboratório, à Fernanda e à Martha pelo valioso auxílio e orientação na MPO;*
- ✓ *Ao Pedro do Biotério pela dedicação e churrascos, e à Adriane (Jamil) pela ajuda.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. João Batista Calixto do Departamento de Farmacologia da UFSC e ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pela cessão de algumas drogas fundamentais para a realização destes trabalhos.*



## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras, esquemas e tabelas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de abreviações.....</b>	<b>xv</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xviii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xx</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 – Dor.....	2
1.1.1 – Classificação.....	2
1.1.2 - Nociceptores e Vias Neurais.....	3
1.1.3 - Neurobiologia da Dor.....	4
1.2 - Dor Inflamatória.....	5
1.3 - Mediadores Inflamatórios.....	8
1.3.1 – Eicosanóides.....	8
1.3.2 – Cininas.....	10
1.3.3 – Aminas Vasoativas.....	11
1.3.4 – Óxido Nítrico.....	12
1.3.5 – Fator de Ativação Plaquetária.....	13
1.3.6 - Citocinas .....	14
1.3.7 – Endotelinas.....	15
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>23</b>

3.1 – Animais.....	24
3.2 - Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	24
3.3 – Mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela ET-1.....	26
3.3.1 - Participação de mastócitos.....	26
3.3.2 - <i>Participação de neutrófilos</i> .....	27
3.3.3 - Envolvimento de distintos mediadores pró-inflamatórios e opióides.....	28
3.3.3.1 - Aminas vasoativas.....	28
3.3.3.2 - Eicosanóides derivados da via das COX e leucotrieno B <sub>4</sub> .....	29
3.3.3.3 - Bradicinina, óxido nítrico e PAF.....	29
<b>3.3.3.4 - Opióides endógenos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.3.5 - Modulação por Glicocorticóides.....</b>	<b>30</b>
3.5 – Apresentação de resultados e análise estatística.....	31
3.6 - Drogas e Soluções.....	31
<b>4. Resultados.....</b>	<b>33</b>
4.1 - Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	34
4.2 - Mediadores implicados na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela ET-1.....	34
4.2.1 - Participação de mastócitos.....	35
4.2.2 - Participação de neutrófilos.....	41
4.2.3 - Envolvimento de distintos mediadores pró-inflamatórios e opióides.....	41
4.2.3.1 – Aminas vasoativas.....	41
4.2.3.2 - Eicosanóides derivados da via das COX e leucotrieno B <sub>4</sub> .....	46

4.2.3.3 - Bradicinina, óxido nítrico e PAF.....	50
<b>4.2.3.4 - Opióides endógenos .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3.5 - Modulação por Glicocorticóides.....</b>	<b>52</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	35
<b>Figura 2</b> – Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de composto 48/80.....	36
<b>Figura 3</b> – Influência do composto 48/80 sobre os efeitos induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	38
<b>Figura 4</b> – Influência do composto 48/80 sobre os efeitos induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de composto 48/80.....	39
<b>Figura 5</b> – Efeito do tratamento com fucoidina sobre as respostas induzidas pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1 e atividade da mieloperoxidase após a injeção <i>i.pl.</i> de ET-1 ou carragenina.....	43
<b>Figura 6</b> – Efeito da pirilamina sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	45
<b>Figura 7</b> – Efeito da administração de ciproheptadina sobre as respostas induzidas pela administração <i>i.pl.</i> de ET-1.....	47
<b>Figura 8</b> – Influência da co-administração da metisergida sobre as respostas induzidas pela administração <i>i.pl.</i> de ET-1.....	48
<b>Figura 9</b> – Influência do pré-tratamento com indometacina e ácido acetil salicílico sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	49
<b>Figura 10</b> – Efeitos da administração de naltrexona sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	53

<b>Figura 11</b> – Influência da dexametasona sobre as respostas induzidas pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1.....	54
---	----

<b>Esquema 1</b> - Representação esquemática da metodologia utilizada para avaliar a nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela ET-1.....	25
--	----

<b>Esquema 2</b> – Representação esquemática da proposta dos mecanismos celulares e mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção <i>i.pl.</i> de ET-1 em camundongos. A proposta é baseada nos resultados do presente estudo, juntamente com aqueles de Khodorova <i>et al.</i> (2003).....	68
---	----

<b>Tabela 1</b> – Influência do tratamento prévio local com BQ-123 e BQ-788 sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzida pela injeção <i>i.pl.</i> de composto 48/80 em camundongos.....	42
---	----

<b>Tabela 2</b> – Influência do pré-tratamento com captopril, HOE-140, CP-105696, UK-74530 e L-NOARG sobre as respostas induzidas pela administração <i>i.pl.</i> de ET-1.....	51
--	----

## LISTA DE ABREVIACES

AA	cido araquidnico
CEUA	Comitê de tica para Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECE	Enzima conversora de endotelina
eNOS	xido Nítrico Sintase endotelial
ETs	Endotelinas
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
GMSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HETEs	cido hidroeicosatetraenico
IASP	International Association for the Study of Pain
ICAM-1	Molécula de Adeso Intracelular
IgE	Imunoglobulina E
IFN- $\gamma$	nterferon - $\gamma$
I- $\kappa$ B	Inibidor citosslico para o NF- $\kappa$ B
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-1ra	Antagonista de receptores IL-1
IL-2	Interleucina-2

IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-18	Interleucina-18
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
<i>i.p.</i>	Via intraperitoneal
<i>i.pl.</i>	Via intraplantar
<i>i.v.</i>	Via intravenosa
Jaks	Janus kinases
LOXs	Lipooxigenases
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTs	Leucotrienos
MCP-1	proteína quimiotática para monócitos-1
NF-κB	Fator transcripcional-κB
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintases
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGs	Prostaglandinas
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLD	Fosfolipase D
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
STATs	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β
TRPV1	Receptores vanilóides VR <sub>1</sub>
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano
TrkA	Tirosina quinase A
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de Adesão Vascular Celular



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção intraplantar (*i.pl.*) de endotelina (ET)-1 em camundongos. Para isto foram utilizadas técnicas farmacológicas e bioquímicas.

A ET-1 (10 e 30 pmol, *i.pl.*) induz comportamento nociceptivo e edema, mas apenas a menor dose potencializa a resposta nociceptiva à capsaicina (i.e. causa hiperalgesia; 0,1 µg, *i.pl.*). O degranulador de mastócitos composto 48/80 (0.3 µg, *i.pl.*) também causou nocicepção, hiperalgesia à capsaicina e edema. O BQ-123 (antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub> para ET-1; *i.pl.*) atenuou apenas a hiperalgesia causada pelo composto 48/80, enquanto o BQ-788 (antagonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub> para ET-1; *i.pl.*) foi desprovido de efeito. Injeções diárias do composto 48/80 (1, 3, 10 e 10 µg, *i.pl.*) preveniram, por completo, a nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos na mesma pata pela ET-1 (10 pmol). O mesmo ocorreu em animais tratados previamente com pirilamina (antagonista de receptores H<sub>1</sub> para histamina; *i.pl.* ou intraperitoneal), com o glicocorticóide dexametasona (intraperitoneal) ou com a ciproheptadina (antagonista para receptores serotoninérgicos e histaminérgicos; intraperitoneal). Já a metisergida (antagonista não seletivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub>; *i.pl.*) não influenciou a nocicepção e o edema mas reduziu a hiperalgesia causada pela ET-1. Por outro lado, o tratamento prévio com HOE-140 (antagonista de receptores B<sub>2</sub> para bradicinina), captopril (inibidor de cininases II), UK 74505 (antagonista de receptores para fator de ativação plaquetária), L-NOARG (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), o ácido acetil salicílico e a indometacina (inibidores não seletivos da enzima ciclooxigenase), fucoidina (inibidor de selectinas P e E) e o CP 105969 (antagonista de receptores

para LTB<sub>4</sub>) não influenciaram quaisquer dos efeitos da ET-1 (10 pmol, *i.pl.*). A naltrexona (antagonista não seletivo de receptores para opióides; intraperitoneal) revelou um efeito hiperalgésico da maior dose de ET-1 à capsaicina.

O conjunto de resultados indica que a capacidade da ET-1 induzir efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico na pata de camundongos depende da ativação de mastócitos locais e é mediada, pelo menos em parte por histamina e serotonina. Além disso, o efeito hiperalgésico da ET-1 à capsaicina pode ser modulada por opióides endógenos.

## ABSTRACT

The present study aimed to assess some of mediators implicated in the nociceptive, hyperalgesic and edematogenic effects of endothelin-1 (ET-1) injected into the hind paw of mice. To this effect, pharmacological and biochemical techniques were employed.

ET-1 (10 or 30 pmol, intraplantar – *i.pl.* - injection) induced nocifensive behavior and edema, but only the highest dose potentiated nociception triggered by capsaicin (*i.e.* caused hyperalgesia; 0,1 µg, *i.pl.*). The mast cell degranulator compound 48/80 (0.3 µg, *i.pl.*) mimicked all three effects of ET-1. BQ-123 (selective endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist; *i.pl.*) reduced only hyperalgesia evoked by compound 48/80, whereas BQ-788 (selective endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist; *i.pl.*) was ineffective. Daily injections of compound 48/80 (1, 3, 10 and 10 µg, *i.pl.*) fully prevented the nociceptive, hyperalgesic and edematogenic effects of ET-1 (10 pmol) in the same hind paw. The same occurred when animals were previously treated with pyrilamine (histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist; *i.pl.* or intraperitoneal), the glucocorticoid dexamethasone (intraperitoneal) or ciproheptadine (dual serotonergic and histaminergic receptor antagonist; intraperitoneal). Methysergide (non-selective serotonin 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist; *i.pl.*) failed to influence nociception and edema caused by ET-1, but reduced its hyperalgesic effect. On the other hand, prior treatment with HOE-140 (bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist), captopril (kininase II inhibitor), UK 74505 (antagonist of receptors for platelet activating factor), L-NOARG (nitric oxide synthase blocker), aspirin and indomethacin (non-selective cyclo-oxygenase blockers), fucoidin (P and E selectin inhibitor) and CP 105969 (LTB<sub>4</sub> receptor antagonist) did not modify any of the effects of ET-1 (10

pmol, *i.pl.*). Naltrexone (non-selective opioid receptor antagonist; intraperitoneal) revealed a hyperalgesic effect of the highest dose of ET-1 to capsaicin.

Taken together, these findings indicate that the capacity of ET-1 to induced nociceptive, hyperalgesic and edematogenic effects when injected into the mouse hind paw depends importantly on activation of local mast cells and is mediated, at least in part by histamine and serotonin. In addition, the hyperalgesic effect of ET-1 towards nociception induced by capsaicin is susceptible to modulation by endogenous opioids.

**PARTE DESTES RESULTADOS FORAM PUBLICADOS:**

PIOVEZAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; FRIGHETTO, M.; SOUZA, G. E.P; HENRIQUES, M. M. O.; RAE, G. A. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. **Br. J. Pharmacol.**, 141: 755-763, 2004.

## ***1. Introdução***

---

## **1.1- Dor**

Assim como outras modalidades sensoriais, a dor é necessária para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. Entretanto quando esta torna-se sustentada, acarreta sintomas secundários como ansiedade e a depressão, diminuindo acentuadamente a qualidade de vida do indivíduo (para revisão ver Hunt e Mantyh, 2001). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1997), define a dor como uma “experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. Esta definição agrega à percepção da sensação dolorosa aspectos psicológicos, sociais, emocionais e ambientais.

### **1.1.1- Classificação**

A dor pode ser classificada quanto à sua duração em três principais tipos. A “dor transitória”, provocada pela ativação de nociceptores tissulares na ausência de danos, cuja função é proteger o organismo de lesões físicas que possam ser provocadas por agentes nocivos do ambiente ou por estresse excessivo em alguma parte dele. A “dor aguda”, por sua vez, é provocada por danos ao organismo e conseqüente ativação de nociceptores. Este processo pode persistir por poucos dias ou semanas, porém se a sensação dolorosa exceder este período, será classificada como “dor crônica”, que pode persistir mesmo depois da recuperação das lesões ou doenças que a originaram (Loeser e Melzack, 1999). A dor crônica pode propiciar o desenvolvimento de quadros onde ocorrem alterações na sua percepção. Dentre estes, a hiperalgesia, que refere-se ao aumento da sensibilidade e/ou reatividade a estímulos nocivos e a alodínia, onde observa-se o aparecimento da dor para estímulos que normalmente não são nocivos (para revisão ver Mannion e Woolf, 2000).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em quatro grupos: 1) “dor nociceptiva”, relacionada com estimulação de nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; 2) “dor neurogênica”, que reflete danos no tecido neuronal periférico e/ou central (dor central); 3) “dor neuropática”, decorrente da disfunção ou lesão de um nervo ou grupo de nervos e 4) “dor psicogênica”, que não tem origem somática identificável e pode refletir fatores psicológicos (para revisão ver Millan, 1999).

### **1.1.2 - Nociceptores e Vias Neurais**

Há aproximadamente um século atrás, Sherrington propôs a existência dos nociceptores, neurônios sensoriais primários que são ativados por estímulos capazes de causar danos teciduais (Sherrington, 1906). Estes nociceptores têm limiares de ativação característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos demonstraram a existência de neurônios sensoriais primários excitáveis por calor nocivo, pressão intensa, frio e compostos químicos irritantes, mas não por aquecimento ou toque suave (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001).

As fibras sensoriais primárias conduzem informações nociceptivas ou não-nociceptivas da pele e muitos órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. Estas fibras podem ser classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, essencialmente em três subgrupos: 1) C, delgadas (0,4 - 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 - 2 m/s); 2) A $\delta$ , médias (2,0-6,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro), mielinizadas, de condução intermediária (12 a 30 m/s) e 3) A $\beta$ , espessas (mais de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 - 100 m/s). Enquanto as fibras C e A $\delta$  transmitem informações



exclusivamente nociceptivas, as fibras A $\beta$  respondem somente ao toque, vibração, pressão e/ou outros tipos de estimulação sensorial que não sejam nociceptivos, como estímulos mecânicos de baixa intensidade (para revisões ver Millan 1999; Julius e Basbaum, 2001). Embora o glutamato seja um dos neurotransmissores excitatórios principais em todos os nociceptores, outros mediadores, muitos dos quais neuropeptídeos atuam como co-transmissores em diferentes sub-classes de nociceptores (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001).

A maioria das fibras C são nociceptores polimodais e respondem a todas as formas de estímulos (térmicos, químicos e mecânicos) e podem ser caracterizadas em dois tipos principais: 1) as que expressam receptores purinérgico P<sub>2X3</sub> e para GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) e sítio de ligação para lectina IB<sub>4</sub>; e 2) as que expressam peptídeos, como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bem como receptores tirosina quinase A (TrkA) de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (para revisão, ver Hunt e Mantyh, 2001).

### **1.1.3 - Neurobiologia da Dor**

Os potenciais de ação de fibras aferentes primárias tipo A $\delta$  e C, que codificam informações nociceptivas, são propagados ativamente até seus corpos celulares (dispostos em gânglios das raízes dorsais - GRDs), bem como ao corno dorsal da medula espinhal. Esta estrutura é dividida em lâminas de Rexed de I a X, com base em sua citoarquitetura. A maioria das fibras nociceptivas periféricas faz sinapse com neurônios secundários nas lâminas I (zona marginal) e/ou II (substância gelatinosa) (Besson e Chaouch, 1987). Estes últimos projetam axônios para áreas superiores do Sistema Nervoso Central, que integram diversas vias ascendentes

nociceptivas (para revisões ver Millan, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Scholz e Woolf, 2002). As duas vias principais são: 1) a espinobraquial, que se projeta para áreas do encéfalo relacionadas com aspectos motivacionais; e 2) a espinotalâmica, que conduz informações nociceptivas a áreas do córtex relacionadas tanto com os aspectos motivacionais quanto sensorial-discriminativos (qualidade, intensidade e localização) da dor. A transmissão de informações nociceptivas pelas vias ascendentes pode ser modulada (i.e. facilitada ou inibida) por fibras mesencefálicas e/ou espinhais descendentes originadas na amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da rafe e do loco cerúleo (Hunt e Mantyh, 2001; Scholz e Woolf, 2002).

## **1. 2 - Dor Inflamatória**

Nociceptores são ativados somente quando a intensidade do estímulo excede o limiar para geração de potenciais de ação. Alterações deste limiar para cima ou para baixo podem constituir mecanismos fisiologicamente importantes, pelos quais o sistema nervoso pode modular a resposta a um estímulo. Contudo, reduções do limiar podem ainda ter conseqüências fisiopatológicas significativas, como as que caracterizam várias síndromes clínicas de dor. Danos teciduais causados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos, infecção, isquemia, tumor ou processo autoimune, deflagram uma resposta inflamatória local sustentada orquestrada por múltiplos mediadores e células do sistema imune. Entre os mediadores incluem-se purinas (ATP), aminas (serotonina, histamina), eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), citocinas (interleucinas e  $\text{TNF}\alpha$ ), fatores de crescimento (NGF e outros), íons (incluindo  $\text{H}^+$  e outros radicais livres) e peptídeos (cininas, taquicinas e endotelinas). Alguns destes mediadores sensibilizam

nociceptores funcionais, enquanto outros ativam nociceptores normalmente “silenciosos” (para revisões, ver Carr e Goudas, 1999 e Scholz e Woolf, 2002).

O recrutamento dos componentes celulares da resposta inflamatória geralmente inicia-se com uma vasodilatação precoce, causando rubor e calor no local. Neste processo, o aumento inicial do fluxo sanguíneo local é substituído por lentificação e posterior estase sanguínea, devido à maior permeabilidade de vênulas pós-capilares, exudação de plasma e formação de edema. Simultaneamente, inicia-se uma sofisticada interação entre células endoteliais e leucócitos circulantes, envolvendo múltiplas moléculas de adesão, que resulta na transmigração destes últimos para espaços extravasculares. Moléculas de adesão importantes incluem as selectinas (responsáveis pela rolagem dos leucócitos sobre as células endoteliais) e as integrinas (que garantem associações firmes entre ambos os tipos celulares; para revisão ver Walzog and Gaehtgens, 2000). Este processo é sincronizado e orientado por mediadores inflamatórios, juntamente com a participação de diversos mecanismos (componentes das cascatas do complemento, da coagulação e da fibrinólise). A transmigração é essencial para que leucócitos possam atuar no foco inflamatório, onde realizam fagocitose e/ou secretam mediadores inflamatórios importantes à resolução do processo inflamatório instalado.

Outra classe de células envolvidas no processo inflamatório são os mastócitos, cujas vias de diferenciação e heterogeneidade são pouco entendidos. Estas células, originam-se de precursores da linhagem hematopoiética e circulam no sangue e sistema linfático antes de habitar os tecidos para adquirir suas características efetadoras finais (Benoist e Mathis, 2002). Os mastócitos são capazes de produzir diversos mediadores e moléculas de sinalização intercelular, conferindo a estas células sua individualidade no sistema imune. Estes mediadores

incluem a histamina, serotonina e numerosas proteases específicas (membros da família triptase e quimase). Após ativação, os mastócitos rapidamente sintetizam metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos. Um programa específico de expressão gênica é também ativado levando à síntese de novo de diversas citocinas, quimiocinas e TNF- $\alpha$ . Os mastócitos ativados sinalizam para o sistema vascular através da histamina e metabólitos do ácido araquidônico; para os monócitos através de propriedades quimiotáticas de citocinas e quimiocinas e para o substrato conectivo via proteases extracelulares. Diversas moléculas podem ativar mastócitos, entre estas encontram-se a imunoglobulina E (IgE), anafilotoxinas, bactérias (por receptores de tipo toll-like), algumas citocinas como o TNF- $\alpha$  e diversos mediadores como a bradicinina e substância P (Mousli et al., 1990; Schmitt et al., 1990; Prodeus et al., 1997; Mekori and Mercalfe 1999; Applequist et al., 2002).

Os macrófagos são recrutados para o sítio inflamatório posteriormente aos neutrófilos e mastócitos. Isso ocorre possivelmente porque muitos dos fatores envolvidos na quimioatração destas células sejam liberadas por neutrófilos (Scapini et al., 2000). Estes incluem MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (Scapini et al., 2000), S100A8 (CP-10) e S100A12 (Geczy, 1996; Yang et al., 2001) e defensinas (Welling et al., 1998).

Estudos recentes sugerem uma correlação temporal entre as células envolvidas na inflamação. A estabilização de mastócitos com cromoglicato de sódio reduz a densidade de macrófagos no sítio de lesão de nervos, devido à redução de fatores produzidos por mastócitos e neutrófilos, que são inicialmente recrutados ao sítio inflamatório (Zuo et al., 2003).

### 1.3 - Mediadores Inflamatórios

Após a lesão tecidual, ocorre uma liberação sincronizada de mediadores inflamatórios que atuam sinergicamente para sinalizar danos locais ou sistêmicos, além de desempenharem funções específicas pró- ou anti-inflamatórias. A seguir serão apresentados alguns dos mais relevantes mediadores envolvidos nos processos inflamatórios.

#### 1.3.1 - Eicosanóides

Os eicosanóides são produtos do processamento do ácido araquidônico (AA) que normalmente é encontrado esterificado a fosfolipídios de membrana, de onde é liberado por ação de fosfolipases, como a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). O AA sofre ação da enzima ciclooxigenase (COX - prostaglandina H sintase) originando intermediários que são convertidos a prostaglandinas e tromboxanos, juntos conhecidos como prostanóides. A COX é uma enzima bifuncional, com atividade de ácido graxo (catalisando a conversão do AA a prostaglandina G<sub>2</sub> - PGG<sub>2</sub>) e atividade de prostaglandina hidroxidase (catalisando a conversão da PGG<sub>2</sub> em prostaglandina H<sub>2</sub> - PGH<sub>2</sub>) (para revisão ver Hinz e Brune, 2002). A PGH<sub>2</sub> é convertida, através de diferentes enzimas com especificidade celular, nas prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, prostaciclina PGI<sub>2</sub> e tromboxano TXA<sub>2</sub>, entre outras (para revisão ver Vane and Botting, 1998; Katori e Majima, 2000; Flower, 2003). Em 1971, Vane demonstrou que drogas antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs), como a aspirina e a indometacina, eram capazes de bloquear a síntese de prostanóides por inibição da atividade da COX. O AA formado através da ação da PLA<sub>2</sub> pode ainda sofrer ação de lipooxigenases (LOXs), como a 5- e 12-LOX, originando os leucotrienos (LTs), o ácido hidroeicosatetraenóico (HETEs) e as

lipoxinas (ver MacMahon et al., 2001). Os LTs são produzidos, predominantemente, por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos (para revisão ver Funk, 2001).

A COX existe como duas isoformas distintas (Fu et al., 1990; Xie et al., 1991). A COX-1 é uma enzima constitutivamente expressa em praticamente todos os tecidos, onde medeia importantes funções homeostáticas (para revisão ver Vane and Botting, 1998). Já a COX-2 é expressa por células que estão envolvidas em processos inflamatórios e tem sido descrita como a isoforma responsável pela síntese de prostanóides envolvidos em processos patológicos como estados inflamatórios agudos e crônicos (para revisão ver Hinz e Brune, 2002; Flower, 2003). Antagonistas seletivos para a COX-2 foram desenvolvidos como uma alternativa mais eficaz para o tratamento da inflamação e dor. Recentes estudos indicam que esta isoenzima também desempenha uma variedade de funções fisiológicas no organismo (Yamagata et al., 1993; Breder et al., 1995; Kömhoff et al., 1997; Majerus, 1998; Hinz e Brune, 2002).

Os eicosanóides estão envolvidos em todos os sinais da inflamação: dor, calor, rubor e edema. As PGs e LTs promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema nos sítios de inflamação. Na dor, atuam em neurônios sensoriais primários, na medula espinhal e SNC, promovendo respostas hiperalgésicas e alodínicas. Os cisteinil-LTs podem causar extravazamento do plasma de vênulas pós-capilares. O LTB<sub>4</sub> é um dos responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos e sua adesão ao endotélio vascular, enquanto o LTD<sub>4</sub> e a 5-oxo-HETE são quimiotáticos para eosinófilos (Funk, 2001; Vane and Botting, 1996; Vane e Botting, 1998). As lipoxinas por sua vez, atuam como mediadores antiinflamatórios, inibindo a infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local da

inflamação, a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias. (MacMahon et al., 2001).

### 1.3.2 - Cininas

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos que inclui a bradicinina, calidina e seus metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina. A bradicinina e calidina são formadas no plasma e tecidos por clivagem proteolítica de cininogênios de alto e baixo peso molecular, respectivamente, pelas calicreínas (para revisão ver Bhoola et al., 1992). Estes peptídeos exercem seus efeitos biológicos através da ativação de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Enquanto as cininas são os agonistas endógenos para o receptor B<sub>2</sub>, a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina são agonistas preferenciais para o B<sub>1</sub>. Ambos os receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G que possui sete domínios transmembrana (Gαg/11 e Gαi) (Couture et al., 2001). O receptor B<sub>2</sub> é constitutivo e está presente em tecidos centrais e periféricos. Estes parecem estar implicados na maioria das ações fisiológicas das cininas. O receptor B<sub>1</sub> é geralmente ausente em tecidos normais e animais saudáveis mas induzido e super expresso durante uma lesão tecidual ou pela administração de endotoxinas bacterianas e citocinas como a IL-1β e fator de necrose tumoral α (TNF-α) (Siebeck et al., 1998). As vias de transdução de sinal para cininas a ativação de fosfolipases A<sub>2</sub>, C e D com subsequente liberação de prostaglandinas, óxido nítrico, fosfatos de inositol e diacilglicerol levando a liberação de cálcio intracelular e ativação de diversas formas de proteínas quinase (Couture et al., 2001).

As cininas estão implicadas em processos fisiopatológicos, especialmente nos processos inflamatórios e na indução da nocicepção (para revisão ver Calixto et

al., 2000). Resultados obtidos com estudos em modelos animais sugerem que os receptores  $B_2$  estão envolvidos na fase inicial das respostas inflamatórias e de nocicepção; os receptores  $B_1$ , por sua vez, participam de fases mais tardias da inflamação e hiperalgesia (Dray et al., 1988; Campos et al., 1998; Campos et al., 1999; Ferreira et al., 2000).

### **1.3.3 - Aminas Vasoativas**

A histamina é liberada (juntamente com a serotonina, em roedores) pelos mastócitos em resposta a diversos estímulos inflamatórios (Parada et al., 2001). Ambas aminas vasoativas exercem um papel fundamental na inflamação, sendo capazes de causar dilatação de vênulas pós-capilares e consequentemente aumentar o fluxo sangüíneo e a permeabilidade vascular (Barnes et al., 1988). Além disso, elas estão implicadas nos processos de nocicepção em diversas condições inflamatórias (Besson, 1997), inclusive em humanos (Sciberras et al., 1987), bem como na formação de edema (Kay, 2001). A histamina e serotonina atuam sinergicamente com a bradicinina, induzindo hiperalgesia térmica (Lavich et al., 2003).

Os receptores para histamina são divididos em três tipos:  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$  (Arrang, 1994). A ativação de receptores histaminérgicos  $H_1$  e  $H_2$  induz a mobilização de cálcio a acúmulo de AMP cíclico, respectivamente. O receptor  $H_3$  está localizado em neurônios histaminérgicos e atua como um autoreceptor (Schwartz et al., 1991). Diversos estudos demonstraram a participação dos receptores  $H_1$  e  $H_2$  na mediação dos processos nociceptivo e inflamatório (Malmberg-Aiello et al., 1998; Mobarant et al., 2000; Parada et al., 2001; Olsen et al., 2002),



A serotonina é estocada em plaquetas e mastócitos de roedores podendo ser liberada sob estímulo inflamatório (Hourani e Cusack, 1991). Esta amina está envolvida na nocicepção e inflamação através dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (Sufka et al., 1992; Doak and Sawynok, 1997, Parada et al., 2001, Lavich et al., 2003). Quando a serotonina é aplicada perifericamente, provoca dor em humanos e aumenta o comportamento de dor em diversos modelos animais. Sua administração endógena estimula uma reação inflamatória que consiste em formação de edema e rubor em humanos e ratos (Maling et al., 1974; Sufka et al., 1992).

#### **1.3.4 - Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO), é sintetizado a partir da L-arginina e oxigênio molecular por um processo enzimático que utiliza elétrons doados pelo NADPH. As enzimas NO sintases (NOS) convertem a L-arginina em N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina que sofre uma oxidação formando L-citrulina e NO. As enzimas responsáveis pela conversão da L-arginina em NO, são as NO sintases (NOS). Uma das formas isoformas de NOS foi originalmente caracterizada em neurônios, conhecida como NOS neuronal (nNOS ou tipo 1) enquanto a outra, foi observada em células endoteliais, a NOS endotelial (eNOS ou tipo II) (para revisão ver Crane et al., 1997; Coleman, 2001). O terceiro tipo de NOS, sintetizada após a ativação celular, foi inicialmente descrita em macrófagos de camundongos (Stuehr and Marlette, 1985; Stuehr and Marlette, 1987), e é conhecida como NOS induzível (iNOS ou tipo III) (Nathan and Xie, 1994; Stuehr and Marlette, 1985; Stuehr and Marlette, 1987). A nNOS e eNOS são ativadas em resposta a uma elevação nas concentrações de cálcio intracelular e formação do complexo cálcio-calmodulina. Por outro lado, a iNOS liga-se à

calmodulina com alta afinidade mesmo em baixas concentrações de cálcio intracelular (para revisão ver Mayer and Andrew, 1998). A expressão da iNOS é induzida por diversos estímulos, incluindo LPS ou citocinas como  $\text{interferon-}\gamma$  ( $\text{IFN-}\gamma$ ), interleucina-1 ( $\text{IL-1}$ ) ou fator de necrose tumoral- $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ) (Nathan and Xie, 1994; Stuehr and Marlette, 1985; Stuehr and Marlette, 1987).

Além das funções fisiológicas do NO, incluindo vasodilatação, citotoxicidade em macrófagos e plasticidade no SNC (Schuman and Madison, 1994), o NO está envolvido no processamento nociceptivo central e periférico (Meller and Gebhart, 1993). Muitos dos dados que sugerem a participação do NO na nocicepção no SNC, são baseados nos efeitos antinociceptivos de inibidores de NOS, como demonstrado em modelos de nocicepção térmica ou mecânica (Przewlocki et al., 1993; Przewlocka et al., 1994; Inoue et al., 1997) ou dor química persistente (Haley et al., 1992; Moore et al., 1992; Babbedge et al., 1993; Malmberg and Yaksh, 1993; Hao and Xu, 1996; Machelska et al., 1997) em roedores. Diversos trabalhos demonstraram o efeito dual do NO no mesmo modelo de nocicepção e/ou inflamação (Sousa et al., 2001; Rocha et al., 2002; Prado et al., 2002).

#### **1.3.5 - Fator de Ativação Plaquetária**

O PAF atua por ligação ao seu receptor que pertence a superfamília dos receptores acoplados à proteína G e desta forma ativa múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo mobilização do fosfatidilinositol, elevação da concentração de cálcio intracelular e ativação de proteínas quinases (para revisão ver Chao e Olson, 1993; Ishii e Shimizu, 2000; Ishii et al., 2002). O termo PAF foi proposto a partir da observação de que esta molécula poderia ser responsável pela da agregação de plaquetas (Benveniste et al., 1972). Sua estrutura química foi determinada em 1979

como 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina por três diferentes laboratórios (Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1979; Benveniste et al., 1979).

Em 1987 já se sabia que o PAF era capaz de causar dor quando injetado intradermicamente em voluntários humanos (Sciberra et al., 1987). Há várias evidências de que o PAF é liberado por células inflamatórias e pode ser um mediador importante de respostas inflamatórias (para revisão ver Vane et al., 1998). A injeção intraplantar (i.pl.) de PAF na pata de ratos pode aumentar a sensibilidade a dor (Dalloub et al., 1987). O mecanismo de ação pelo qual o PAF exerce suas ações na dor inflamatória ainda não está bem estabelecido.

#### **1.3.6 - Citocinas**

A produção inicial de citocinas em resposta a um estímulo determina primeiramente o desenvolvimento de uma resposta imune e subsequente se esta resposta é citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica (para revisão ver Borish e Steinke, 2003, Packard and Khan, 2003). Estas proteínas de baixo peso molecular podem atuar de forma autócrina ou parácrina (Ali et al., 1997; Breen, 2002). Ao ativar seu(s) receptor(es), as citocinas estimulam vias de sinalização celular que normalmente resultam em nova expressão gênica, levando a proliferação e/ou diferenciação celular (Breen, 2002).

Os receptores para citocinas geralmente apresentam-se como monômeros que possuem um domínio tirosina quinase inativo em seu segmento citoplasmático. Após a ligação da citocina, ocorre uma dimerização do receptor que resulta na justaposição de seus segmentos citoplasmáticos, permitindo a ativação dos

domínios tirosina quinase com proteínas intracelulares. Embora numerosas cascatas bioquímicas estão envolvidas na sinalização das citocinas, a principal refere-se à fosforilação da tirosina quinase denominada Janus kinases (Jaks) e a ativação de fatores de transcrição, STATs (Signal transducers and activators of transcription) (Moore et al., 2001; Gadina et al., 2001; Kotenko, 2002; Fickenscher et al., 2002, Borish e Steinke, 2003).

As citocinas podem ter ações pró e antiinflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias podem ser representadas principalmente pela interleucina (IL) –1 (IL-1), IL-2, IL-12, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Os principais produtores das citocinas pró-inflamatórias são os linfócitos T auxiliares (Th) CD4<sup>+</sup>, subtipo Th<sub>1</sub>, e monócitos/macrófagos (para revisão ver Opal e DePalo, 2000).

As citocinas antiinflamatórias são capazes de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias (Hart et al., 1989; Fiorentino et al., 1991; Cassatella et al., 1993; Callard et al., 1996). Estas incluem a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o antagonista de receptores IL-1, o IL-1ra (para revisão ver Opal e DePalo, 2000). Elas são produzidas especialmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do subtipo Th<sub>2</sub>, mas também por monócitos/macrófagos, mastócitos, entre outros (para revisão ver Opal e DePalo, 2000).

### **1.3.7 - Endotelinas**

As endotelinas (ETs) constituem uma família de peptídeos sendo eles ET-1, ET-2 e ET-3. Os três peptídeos contêm 21 resíduos de aminoácidos e apresentam grande homologia estrutural com as sarafotoxinas, peptídeos presentes no veneno da serpente israelense *Actractaspis engaddensis* (Yanagisawa et al., 1988; Inoue et al., 1989; Haynes e Webb, 1993).

A seqüência de cada endotelina é determinada por um distinto gene que codifica a pre-pro-endotelina correspondente (Inoue et al., 1989). Estes precursores são clivados a pro-peptídeos denominados big-endotelinas (Denault et al., 1995), que são convertidas a peptídeos maduros pela ação da enzima conversora de endotelina (ECE). Até o momento foram clonadas duas ECEs, ambas apresentam grande eficácia sobre a big-ET-1, -2 ou -3 e são inibidas por fosforamidon (para revisão ver Rae e Henriques, 1998).

As endotelinas exercem suas ações através da interação com receptores específicos pertencentes à família de receptores acoplados a proteínas G. Dois destes receptores foram clonados em mamíferos: o receptor ET<sub>A</sub>, que possui maior afinidade pela ET-1 do que pela ET-3 (Arai et al., 1990), e o receptor ET<sub>B</sub> que apresenta igual afinidade entre os peptídeos (Sakurai et al., 1990). Já o receptor ET<sub>C</sub>, que foi clonado apenas do genoma de anfíbios, exibe maior afinidade à ET-3 do que à ET-1 (Karne et al., 1993). O receptor ET<sub>A</sub> é seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos (BQ-123 e FR139317, entre outros) e não peptídicos (BMS-182874 ou A-127722). O receptor ET<sub>B</sub> possui a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 como agonistas seletivos, bem como antagonistas seletivos peptídicos (BQ-788 ou RES-701-1) e não peptídicos (A-192621). Existem ainda antagonistas não seletivos para ambos receptores como o bosentan, SB 217242 e TAK-044 (Masaki et al., 1994; Rae et al., 1995; Opgenorth et al., 1996). A diversidade de ação das endotelinas pode ser explicada em termos pela existência de receptores que podem modular a atividade de diversos efetores intracelulares, incluindo proteínas como a proteína quinase (PK)-C, fosfolipase (PL) -A<sub>2</sub> e PL-D, além de canais ou bombas trocadoras de íons como a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Simonson et al., 1989; Kramer et al., 1990; Vigne et al., 1991; Battistini et al., 1991).

Embora as ETs possam estar relacionadas ao controle fisiológico normal de certas funções, sua maior relevância parece ser no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, inflamação e dor entre outros (para revisões ver Rubanyi and Polokoff 1994; Webb and Meek, 1997; Miyauichi and Masaki, 1999; Schiffrin, 2000; Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

A produção/secreção de ETs pode ser estimulada, por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), carragenina, citocinas, fatores de crescimento, autacóides, entre outros (Bertelli et al., 1992; Sugiura et al., 1989; Vemulapalli et al., 1994; Klemm et al., 1995; para revisão ver Rae and Henriques, 1998, Wijayagunawardane et al., 2003). O LPS aumenta a produção de ETs em diferentes culturas de células (Sugiura et al., 1989, Ohlstein et al., 1991; Casey et al., 1991; Nakano et al., 1994) e pode aumentar a síntese do RNA mensageiro para ETs ou para alguns de seus precursores (Eakes et al., 1997; Guo et al., 1998). Os macrófagos (Ehrenreich et al., 1990), monócitos (Ehrenreich et al., 1993; Cunningham et al., 1991) e mastócitos (Ehrenreich et al., 1992) tratados com LPS, sintetizam e secretam ETs. Além disso, citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, podem estimular a síntese de ETs a partir de células endoteliais (Yoshizumi et al., 1990; Kanse et al., 1991; Lamas et al., 1992; Marsden and Brenner., 1992; Kohan et al., 1992; Maemura et al., 1992; Katabami et al., 1992), Outras interleucinas como a IL-2, IL-6 e IL-8, aumentam os níveis do peptídeo em células epiteliais (Endo et al., 1992). Diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento e transformação (TGF)- $\beta$ 2 e o TGF- $\beta$ 1, também estimulam a produção de endotelina (Lees et al., 2000; Gonzales et al., 2001).

Por outro lado, a ET-1 é um estímulo efetivo para induzir a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias (Helset et al., 1993; Stankova et al., 1996; Woods

et al., 1999), proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) e fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GMSF) (Huribal et al., 1992; Cunningham et al., 1993; Helset et al., 1993). Outras atividades pró-inflamatórias das ETs referem-se à capacidade do peptídeo causar febre (Fabrício et al., 1998), aumentar a permeabilidade vascular induzindo edema (Sirois et al., 1992; Kurose et al., 1993; Sampaio et al., 1995), induzir a ativação (Ishida et al., 1990) e recrutamento de leucócitos (McCarron et al., 1993; Ishizuka et al., 1999; Zouki et al., 1999, Sampaio et al., 2000). As ETs podem também ativar e degranular mastócitos (Uchida et al., 1992; Yamamura et al., 1994) que possuem receptores ET<sub>A</sub> na superfície de sua membrana. O estímulo com ET-1 faz com que haja degranulação destas células e liberação de histamina e leucotrieno C<sub>4</sub>. Esta indução na liberação de histamina é iniciada e alcança um pico máximo mais rapidamente que a liberação induzida por LPS (Yamamura et al., 1994; Yamamura et al., 1995). As ETs também aumentam a expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 (Molécula de Adesão Intracelular), VCAM (Molécula de Adesão Vascular Celular) e E-selectina, importantes para a migração de neutrófilos da circulação ao tecido durante um processo inflamatório (MacCarron et al., 1993; Duperray et al., 1995; Ishizuka et al., 1999). A ET-1 é um potente liberador de prostanóides (Touvay et al., 1990; D'Orléans-Juste et al., 1992; De Nucci et al., 1988). Assim, o peptídeo aumenta a expressão da COX-2 e estimula a produção de PGE<sub>2</sub> (Shimada et al., 1998) e TXA<sub>2</sub> (Filep et al., 1991; Ninomiya et al., 1992; Hay et al., 1993). Recentes dados sugerem que a ET-1 é capaz de ativar o fator transcripcional-κB (NF-κB). Isto pode ocorrer em parte, via receptores ET<sub>B</sub> ou por degradação do inibidor citossólico para o NF-κB, I-κB (Wilson et al., 2001).

Além de sua importância na inflamação, as ETs parecem exibir propriedades nociceptivas. A administração destes peptídeos induz contorções abdominais em ratos e camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos e incapacitação articular em cães e ratos (Raffa and Jacoby, 1991; Ferreira et al., 1989; De-Melo et al., 1998; Cunha et al., 2001). Em humanos, a injeção intradérmica de ET-1 no antebraço induz uma resposta de prurido intenso e um efeito hiperalgésico, sensibilizando a área circunjacente a estímulos mecânicos (Ferreira et al., 1989). Além disso, voluntários que receberam infusão de ET-1 na artéria braquial, relataram dor profunda no antebraço, a qual foi aumentada ao toque ou por contração muscular (Dahlof et al., 1990).

No entanto, existem controvérsias quanto ao tipo de receptor endotelinérgico envolvido nas respostas de dor. A ET-1 é encontrada em altas concentrações nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) (Giaid et al., 1989) e células satélite (Kar et al., 1991). O receptor  $ET_A$  para endotelina, é encontrado em fibras C e fibras  $A\delta$ , no GRD e em seus axônios (Pomonis et al., 2001). Os receptores  $ET_B$ , estão localizados nas células satélites do GRD e em células de Schwann, não mielinizadas (Pomonis et al., 2001). Recentemente demonstrou-se que a administração subcutânea de ET-1 na pata de ratos produz um comportamento de dor (flinching) por excitação de fibras nociceptivas C e  $A\delta$  via receptores  $ET_A$  (Gokin et al., 2001). Outros autores sugerem que a ativação de receptores  $ET_A$  contribui para a nocicepção em alguns tipos de dor aguda e dor crônica. Além disso, o ABT-627, um antagonista seletivo de receptores  $ET_A$  atenuou a alodínia mecânica em um modelo de dor neuropática em ratos (Jarvis et al., 2000). Por outro lado, a ativação de receptores  $ET_B$  pode contribuir para os efeitos nociceptivos observados na inflamação cutânea e visceral (Griswold, 1999).



A injeção i.pl. de ET-1 em camundongos induz uma resposta comportamental nociceptiva per se caracterizada pelo ato de lambear a pata (Menéndez et al., 2002; Piovezan et al., 2000), potencializa respostas nociceptivas evocadas por diferentes agentes químicos e inflamatórios (De-Melo et al., 1998; Piovezan et al., 1997) e induz a formação de edema (Piovezan et al., 2000). Em ratos, a aplicação de ET-1 à superfície epineural do nervo ciático também promove um comportamento nociceptivo (Davar et al., 1998). Além disso, a administração subcutânea de ET-1 na pata induz comportamentos nociceptivos, os quais coincidem com a despolarização de fibras aferentes primárias (Gokin et al., 2001; Khodorova et al., 2003). As respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas após a injeção i.pl. de ET-1 parecem depender exclusivamente da ativação de receptores do tipo ET<sub>A</sub> (Ihara et al., 1992; Piovezan et al., 1998; Piovezan et al., 2000). Embora a administração de doses mais elevadas de ET-1 cause nocicepção e edema, o efeito hiperalgésico não se manifesta, a não ser após pré-tratamento local com um antagonista seletivo de receptores ET<sub>B</sub> (Piovezan et al., 2000). Essa observação, aliada ao fato que agonistas seletivos de receptores ET<sub>B</sub>, como a sarafotoxina S6c e IRL 1620, inibem a hiperalgesia induzida por uma dose baixa de ET-1 (10 pmol) ou pela serotonina, demonstram a presença de receptores ET<sub>B</sub> locais que modulam seletivamente a hiperalgesia, mas não o efeito nociceptivo ou edematogênico da ET-1. Estes resultados reforçam a idéia de uma atividade pró-inflamatória e pró-nociceptiva destes mediadores (para revisão ver Rae e Henriques, 1998). Entretanto, os mecanismos celulares e mediadores envolvidos nas respostas induzidas pela injeção i.pl. de ET-1 em camundongos são ainda desconhecidos.

## ***2. Objetivos***

---

## 2.1- Objetivo Geral

O presente estudo foi desenvolvido com o propósito de identificar os mediadores envolvidos nas respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas pela injeção intraplantar de endotelina-1 (ET-1) em camundongos.

## 2.2- Objetivos Específicos

- Avaliar a participação de mastócitos na mediação dos efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico induzidos pela injeção de ET-1 na pata de camundongos;
- Investigar se a migração de neutrófilos contribui para as respostas induzidas à injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos;
- Analisar se histamina e/ou serotonina podem mediar as respostas à ET-1 em camundongos;
- Verificar se produtos da via da cicloxigenase, leucotrieno B<sub>4</sub>, bradicinina, óxido nítrico (NO) ou fator de ativação plaquetária (PAF) estão implicados na mediação dos efeitos induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1;
- Determinar se opióides endógenos estão implicados nas respostas comportamentais induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1;
- Avaliar se os glicocorticóides têm influência sobre os três efeitos da aplicação *i.pl.* de ET-1 em camundongos.

### ***3. Material e Métodos***

---

### 3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após o desmame, os animais foram alojados em gaiolas plásticas no Biotério Setorial da Coordenadoria de Farmacologia, em ambiente controlado quanto às condições de temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e luminosidade (ciclo de claro/escuro), onde tiveram acesso livre a água e ração especial para roedores. Os animais com cerca de 30 a 40 g (aproximadamente 2 meses de idade), foram levados ao laboratório 24 h antes do experimento (período de adaptação). Todos os experimentos foram realizados no período entre 08:00 e 17:00 h, seguindo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC e os princípios éticos para experimentação animal propostos pela *International Association for the Study of Pain* (IASP, 1983).

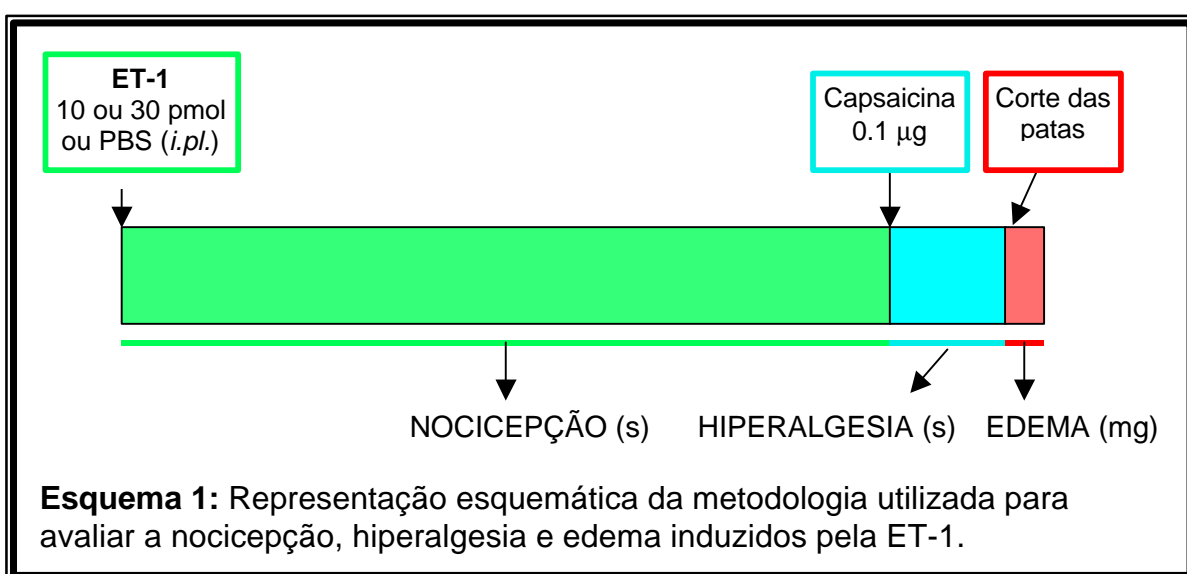
### 3.2 - Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos

Os animais receberam uma injeção intraplantar (*i.pl.*) de endotelina-1 (ET-1) ou veículo (solução salina tamponada com fosfato – *phosphate-buffered saline* – PBS) na pata traseira direita e foram colocados individualmente sob funis de vidro invertidos, atrás do qual foi apoiado um espelho (num ângulo de aproximadamente 70° em relação à bancada) para facilitar a visualização do animal. O tempo que cada animal despendeu lambendo ou mordendo a pata tratada foi registrado (em s), com auxílio de cronômetro, por um período cumulativo de 30 minutos, e considerado como índice de nocicepção.

Após 30 min, administrou-se uma injeção *i.pl.* de capsaicina (0,1 µg em 20 µl de PBS contendo DMSO a 1 %) na pata ipsilateral e cronometrou-se o tempo de

lambida da pata tratada nos 5 min subsequentes. A capsaicina, substância ativa da pimenta vermelha, induz um comportamento nociceptivo através da ativação de receptores vanilóides VR<sub>1</sub> (também conhecidos como TRPV1; Caterina *et al.*, 1997). O aumento desta nocicepção pela ET-1, foi utilizado como índice de hiperalgesia. A dose de capsaicina utilizada neste trabalho foi escolhida por induzir uma resposta nociceptiva significativa, mas claramente submáxima, desacompanhada de efeito edematogênico (Piovezan *et al.*, 1998).

Após este período (i.e. 35 min após a primeira injeção), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, ambas as patas foram cortadas na junção tíbio-tarsal e o edema foi avaliado pela diferença de peso (em mg) entre a pata tratada e a pata contralateral (não tratada).



### 3.3 – Mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela ET-1

Os grupos de animais envolvidos neste trabalho foram tratados com drogas que atuam sobre os principais sistemas relacionados à processos inflamatórios, a fim de desvendar os mecanismos celulares e mediadores envolvidos nas respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 em

camundongos. As doses e vias de administração foram utilizadas de acordo com dados previamente descritos na literatura e levou-se em consideração principalmente o modelo e a espécie utilizada. Nestes experimentos, os grupos controles correspondentes sempre foram tratados somente com os veículos apropriados de modo idêntico aos experimentais, e ambos os grupos foram testados em paralelo.

### 3.3.1 - Participação de Mastócitos

Para avaliar a participação de mastócitos na indução dos efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico causados pela ET-1, cada animal recebeu injeções *i.pl.* de composto 48/80, um degranulador de mastócitos (Mousli *et al.*, 1990), em 4 dias consecutivos na pata traseira direita. As doses utilizadas foram 1, 3, 10 e 10 µg/pata no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia, respectivamente. No quinto dia, a pata ipsilateral foi tratada com ET-1 (10 pmol) *i.pl.* e foram avaliadas as respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica, como descrito anteriormente.

Em outro grupo de experimentos, avaliou-se os possíveis efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico do composto 48/80. Nestes experimentos, distintos grupos receberam uma única injeção *i.pl.* do composto (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 µg), e foram avaliados do mesmo modo adotado para ET-1.

Para determinar o possível envolvimento de endotelinas endógenas nos efeitos agudos do composto 48/80, grupos distintos de camundongos foram tratados com antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos antes da injeção do degranulador de mastócitos. Os antagonistas BQ-123 ou BQ-788 (antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, respectivamente; 1 e 3 nmol) foram administrados por via *i.pl.* 15 min antes de composto 48/80 (0,3 µg).

### 3.3.2 - Participação de neutrófilos

Para avaliar a participação da migração de neutrófilos para o local da injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos, foi realizado o tratamento com fucoidina (10 mg/Kg), um inibidor de selectinas P e E (Teixeira e Hellewell, 1997). Estes polissacarídeos são necessários para que neutrófilos realizem a migração para o local da inflamação. Quinze minutos após administração intravenosa (*i.v.*) da fucoidina, cada animal recebeu uma injeção *i.pl.* de ET-1 e as respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica foram avaliadas como descrito anteriormente.

Com a finalidade de avaliar indiretamente a migração de neutrófilos, foi determinada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), segundo a metodologia descrita por Souza *et al.*, (2000) e Campos *et al.*, (2002). Grupos diferentes de quatro animais receberam injeções *i.pl.* de veículo (PBS, 60 min antes), ET-1 10 pmol (em PBS, 15, 30, 60 e 120 min antes) ou carragenina 300 µg (120 min antes). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 3 vezes. Decorrido o tempo de tratamento, os animais foram sacrificados e o tecido subcutâneo das patas tratadas removido, lavado em solução salina contendo EDTA (0,015 M) e rapidamente congelado em N<sub>2</sub>. As amostras coletadas foram devidamente identificadas e armazenadas – 70 °C até serem avaliadas.

No dia da dosagem da enzima, as amostras foram descongeladas e os tecidos homogeneizados a 5 % (peso/volume) em tampão salina-EDTA (pH 4,7) e centrifugados por 15 min a 10000 rpm, 4°C. O precipitado foi resuspenso em tampão contendo brometo de haxadecil-trimetilamônio 0,5 % (pH 5,4). As amostras



congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Procedeu-se uma nova centrifugação por 15 min a 10000 rpm, 4°C.

O sobrenadante foi imediatamente transferido, em alíquotas de 25 µl, para uma placa de 96 poços. Adicionou-se então o mesmo volume de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio 0,3 mM, a placa foi incubada a 37 °C durante 5 min. A absorbância foi medida em 650-690 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica por mg de tecido.

### **3.3.3 - Envolvimento de distintos mediadores pró-inflamatórios e opióides**

#### **3.3.3.1 - Aminas vasoativas**

Para avaliar se a histamina poderia estar envolvida na nocicepção, hiperalgesia e/ou edema causados pela injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos, administrou-se pirilamina, um antagonista de receptores H<sub>1</sub> para histamina, via intraperitoneal (*i.p.*) ou *i.pl.*. O tratamento sistêmico (10 mg/Kg) foi administrado 30 min antes da injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol), enquanto o local (400 µg) foi co-administrado juntamente com ET-1.

Experimentos semelhantes foram realizados para investigar a influência da ciproheptadina, droga que bloqueia tanto receptores H<sub>1</sub> para histamina quanto vários sub-tipos de receptores 5-HT para serotonina, e da metisergida, um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub> para serotonina (Mylecharane, 1989). A ciproheptadina (2 mg/Kg) foi administrada via *i.p.*, 30 min antes da ET-1, enquanto a metisergida (30 nmol) foi administrada juntamente com a ET-1 por via *i.pl.*. Posteriormente, avaliou-se a nocicepção, hiperalgesia e edema conforme descrito anteriormente.

### 3.3.3.2 - Eicosanóides derivados da via das ciclooxigenases e Leucotrieno B<sub>4</sub>

A participação de eicosanóides e de leucotrieno B<sub>4</sub> foi avaliada através da administração de inibidores não seletivos para a COX e de um antagonista de receptores LTB<sub>4</sub> para leucotrienos. Grupos diferentes foram pré-tratados com indometacina (3 mg/Kg, *i.p.*, 60 min), ácido acetil salicílico (10 e 30 mg/Kg, *i.p.*, 30 min) e CP 105696 (3 mg/Kg, *s.c.*, 30 min). Após estes períodos a ET-1 foi injetada *i.pl.* e os comportamentos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico foram analisados de acordo com o protocolo anteriormente descrito.

### 3.3.3.3 - Bradicinina, óxido nítrico e PAF

Camundongos foram pré-tratados com o inibidor de cininase II, captopril (10 mg/Kg, *i.p.*) ou com antagonista de receptores B<sub>2</sub> para bradicinina, HOE-140 (50 nmol/Kg, *s.c.*) 60 min antes da administração *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). Outros grupos de animais receberam o antagonista de receptores para o fator de ativação plaquetária (PAF) UK 74505 (1 mg/Kg, *i.v.*), ou o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), L-NOARG (1,4 μmol, *i.pl.*), 15 minutos ou co-administrado à ET-1, respectivamente. A seguir foram observados os efeitos comportamentais e edematogênico causados pela injeção do peptídeo.

### 3.3.3.4 - Opióides endógenos

O antagonista não seletivo de receptores opióides, naltrexona, foi utilizado para identificar se os opióides endógenos estão envolvidos na indução das respostas à ET-1, quando esta é injetada *i.pl.* em camundongos. Para isto, cada animal recebeu naltrexona (5 mg/Kg, *i.p.*), 30 min antes da injeção *i.pl.* da ET-1 (10 e 30 pmol). A seguir os camundongos foram colocados individualmente sob funis de

vidro e avaliou-se a nocicepção e a hiperalgesia à capsaicina como descrito acima. O edema de pata também foi mensurado após o sacrifício do animais, através da diferença de peso entre as patas.

#### 3.3.3.5 - Modulação por Glicocorticóides

Em outro grupo experimental, os animais foram pré-tratados com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c.), 4 h antes da injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). Esta dose, bem como o tempo e via de administração, parecem ser efetivos em outros modelos experimentais envolvendo dor e inflamação. Após este período, foram avaliados os efeitos nociceptivo, hiperalgésico, edematogênico como descrito anteriormente.

### 3.5 - Apresentação de Resultados e Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 8 experimentos. Em todas as análises estatísticas, levou-se em consideração as respostas dos animais tratados com drogas paralelamente àqueles tratados com veículo, para minimizar a interferência de possíveis flutuações da reatividade. Assim, respostas em cada grupo tratado com droga foram comparadas àquelas de seu grupo controle correspondente. Os resultados foram estatisticamente avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni, utilizando o pacote estatístico do GraphPad Prism<sup>®</sup>. O nível mínimo de significância em todos os casos foi fixado em  $P < 0,05$ .

### 3.6 - Drogas e Soluções

Para a realização deste trabalho, as seguintes drogas foram utilizadas: endotelina-1, BQ-123 (ciclo[DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]; *American Peptide Co., Sunnyvale, U.S.A.*) e BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-*g*-metilleucil-D-1-metoxicarboil-D-norleucina; *Research Biochemicals International, Natick, U.S.A.*), capsaicina (*Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.*), composto 48/80, carragenina Lambda IV, fucoidina, metisergida, ciproheptadina, indometacina, cloridrato de naltrexona, ácido acetil salicílico, dexametasona, captopril, maleato de pirilamina, HOE-140 ([D-Arg-(Hip<sup>3</sup>, Tir<sup>5</sup>, D-Tic<sup>7</sup>, Oic<sup>8</sup>) bradicinina), L-NOARG (L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina - *Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.*), UK-74505 (4-(2-clorofenil)-1,4-diidro-3-etoxicarbonil-6-metil-2-[4-(2-metilimidazol-[4,5-*c*]-pirid-1-il)-fenil]-5-[N-(2-piridil)-carbamoil]-piridina) (Dr. J. Parry, *Pfizer Central Research, Kent, UK*), CP-105696 (Laboratório *Pfizer Global Research and Development, Groton Labs, CT, U.S.A.*).

As soluções estoque de ET-1, BQ-123 e BQ-788 foram dissolvidas em PBS. Todas as soluções estoque foram mantidas a  $-18^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de 30 a 50  $\mu\text{l}$  em concentrações de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  M e diluídas para a concentração desejada imediatamente antes dos experimentos, no mesmo veículo utilizado anteriormente. A capsaicina foi inicialmente dissolvida em DMSO a 50% em PBS na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ , e diluída posteriormente até uma solução final na concentração 5  $\mu\text{g/ml}$  em DMSO a 1% em PBS.

Para obter uma solução homogênea de L-NOARG foi necessário utilizar HCl 1 N até a concentração de 10 %; após este procedimento, a solução foi neutralizada com NaOH 1 N. O UK-74505 foi dissolvido em HCl (0,1 N), o CP-105696 em DMSO (concentração final inferior a 1 %). As demais drogas foram dissolvidas em PBS. Para evitar qualquer perda em sua estabilidade e efetividade, todas as drogas foram dissolvidas para a concentração desejada, a partir de soluções estoques ou não, momentos antes dos experimentos.

## ***4. Resultados***

---

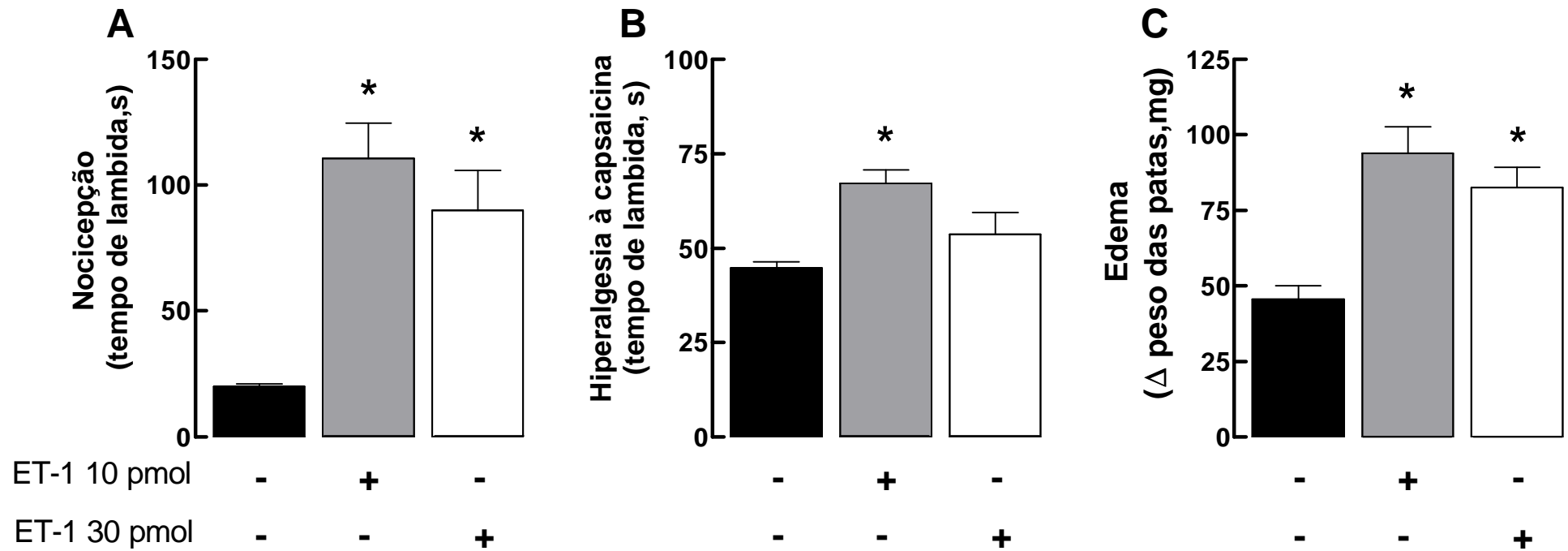
#### **4.1 - Nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos**

A injeção de ET-1 (10 e 30 pmol) na pata traseira direita de camundongos induziu nocicepção, efeito caracterizado pela resposta comportamental de lambar o membro tratado (Figura 1 A). Além da nocicepção, observada até 30 min após a injeção intraplantar (*i.pl.*) de ET-1 (10 pmol), o peptídeo também foi capaz de potencializar respostas nociceptivas (i.e. causar hiperalgesia) induzidas pela injeção de capsaicina (0,1 µg). Contudo, na dose de 30 pmol, a ET-1 induziu nocicepção mas não o efeito hiperalgésico (Figura 1 B). Após o sacrifício dos animais, suas patas foram removidas para avaliar a variação do peso entre a pata ipsilateral e a pata não-tratada (contralateral). Com isso, observou-se que a ET-1 (10 e 30 pmol) aumentou o volume da pata em relação à contralateral (Figura 1 C). Estes resultados reproduzem integralmente os relatados por Piovezan *et al.*, (1998, 2000).

#### **4.2 - Mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela ET-1**

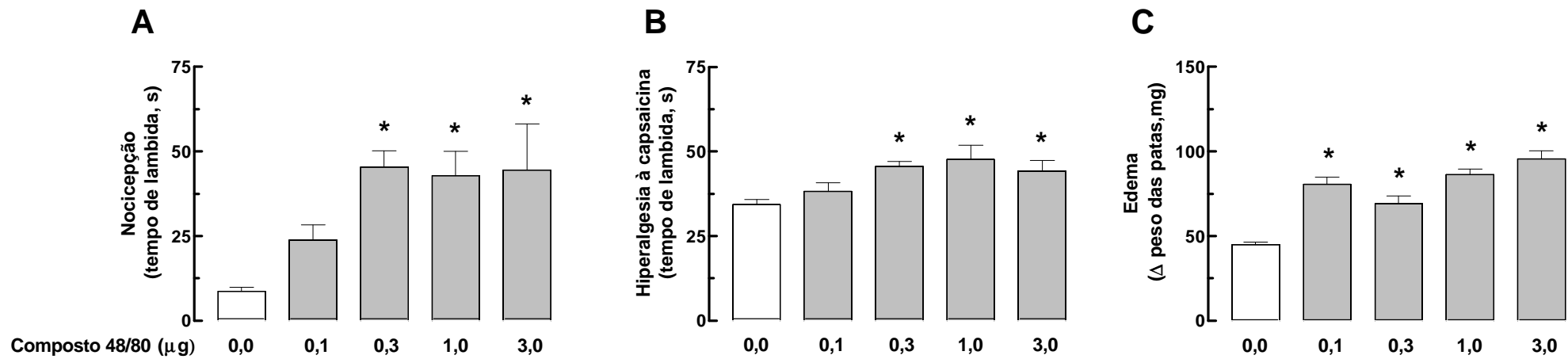
##### **4.2.1 - Participação de mastócitos**

Quando o degranulador de mastócitos composto 48/80 foi injetado *i.pl.* em camundongos, induziu *per se* uma resposta nociceptiva caracterizada pelo comportamento de lambida da pata tratada. Esta resposta foi estatisticamente significativa em relação ao controle quando injetada nas doses 0,3; 1 e 3 µg/pata, mas não na menor concentração (0,1 µg) (Figura 2A). O mesmo ocorreu em relação à hiperalgesia, ou seja, o composto 48/80 foi capaz de aumentar de respostas ao estímulo químico com capsaicina (0,1µg) (Figura 2B). Além disso, observou-se



**Figura 1** – Respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 e 30 pmol). A nociceção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada e foi medida durante 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgesia foi mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam as respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS (ANOVA seguido de Bonferroni).





**Figura 2** – Respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de composto 48/80 (0,1; 0,3; 1 e 3  $\mu$ g). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada e foi medido durante 30 min após a administração *i.pl.* de composto 48/80 ou PBS (painel A). A hiperalgisia foi mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam as respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS (ANOVA seguido de Bonferroni).

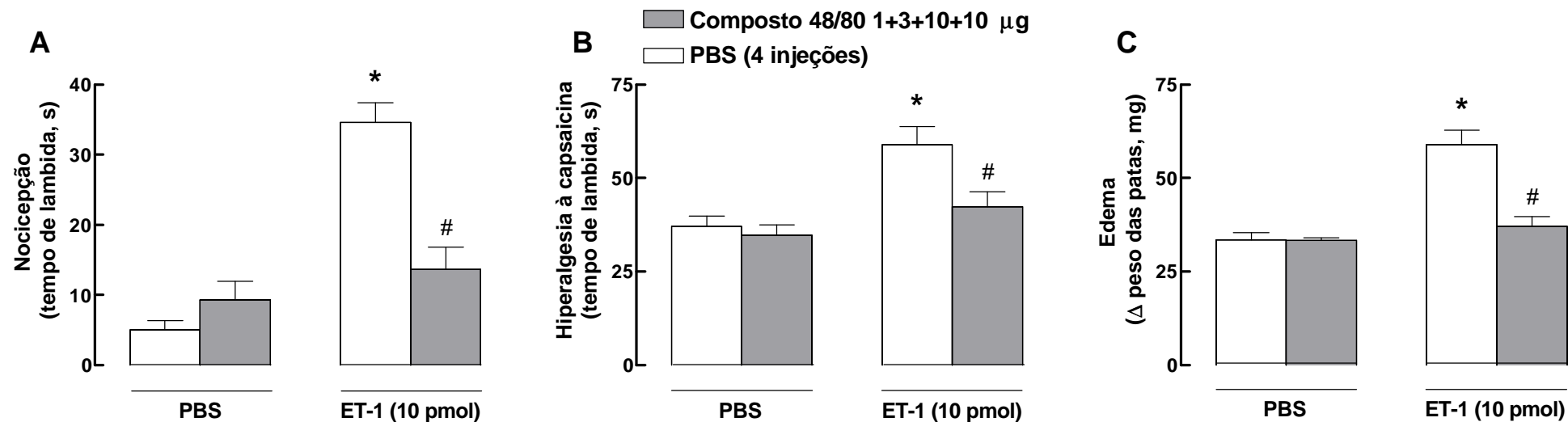


uma elevação no volume da pata tratada para todas as doses utilizadas (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 µg) (Figura 2C). Assim, o composto 48/80 induz respostas muito semelhantes às observadas quando a ET-1 é injetada *i.pl.* em camundongos. A dose de 0,3 µg do degranulador de mastócitos foi utilizada nos experimentos posteriores (descritos nos dois parágrafos subseqüentes), pois foi a menor dose a induzir respostas semelhantes à ET-1. O tratamento prévio *i.pl.* dos camundongos por 4 dias consecutivos com o composto 48/80 (1+3+10+10 µg) inibiu completamente as respostas nociceptivas (Figura 3A), hiperalgésicas (Figura 3B) e edematogênicas (Figura 3C) induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). As porcentagens de inibição dos efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da ET-1 acarretados pelo tratamento repetido com composto 48/80 foram de 85, 66 e 86%, respectivamente.

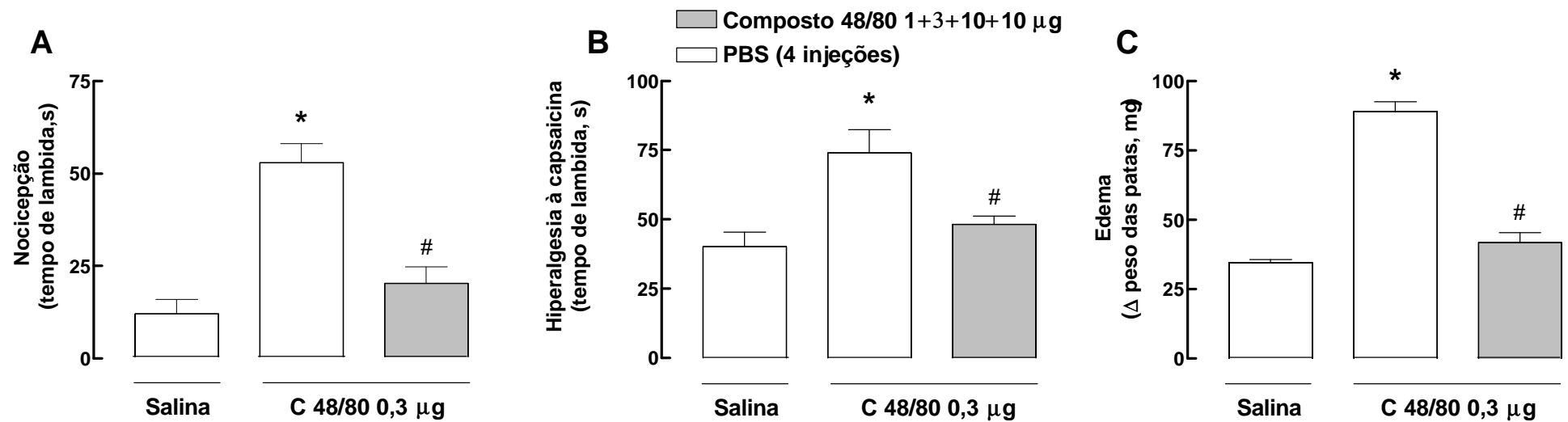
A injeção *i.pl.* com o composto 48/80 durante 4 dias consecutivos, descrito acima, também foi efetivo em reduzir a nocicepção (Figura 4A), a hiperalgesia (Figura 4B) e o edema (Figura 4C) induzidos pelo próprio composto 48/80, na dose de 0,3 µg/pata no quinto dia. A porcentagem de inibição foi de 74% para a nocicepção, 62% para a hiperalgesia e 83% para o edema.

Para tentar desvendar se endotelinas endógenas, liberadas por mastócitos, estão envolvidas nos processos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico induzidos pela injeção de composto 48/80, realizou-se o tratamento local com antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, o BQ-123 o BQ-788, respectivamente. O BQ-123 (1 e 3 nmol) ou o BQ-788 (1 e 3 nmol), foram administrados 15 min antes do composto 48/80 (0,3 µg). Nas doses testadas, ambos





**Figura 3** – Influência do pré-tratamento dos animais com o degranulador de mastócitos composto 48/80 (1+3+10+10 µg) por 4 dias consecutivos, sobre os efeitos induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol) no quinto dia. A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada nos 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgesia foi medida após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1 µg), durante 5 min (painel B) e o edema foi avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam as respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS e #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle para a ET-1 (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 4** – Influência do pré-tratamento dos animais com o degranulador de mastócitos composto 48/80 (1+3+10+10 µg) por 4 dias consecutivos, sobre os efeitos induzidos pela injeção *i.pl.* de composto 48/80 (0,3 µg) no quinto dia. A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada foi nos 30 min após a administração *i.pl.* de composto 48/80 ou PBS (painel A). A hiperalgesia mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1 µg) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam as respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS e #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle para a composto 48/80 (ANOVA seguido de Bonferroni).

antagonistas foram incapazes de interferir nas respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pela injeção *i.pl.* do degranulador de mastócitos em camundongos. Somente o BQ-123, na maior dose, reduziu a hiperalgesia, enquanto que o BQ-788 em ambas concentrações, não influenciou esta resposta (Tabela 1).

#### **4.2.2 – Participação de neutrófilos**

O tratamento prévio dos animais com o inibidor de selectinas P e E, fucoidina (10 mg/Kg, *i.v.*; 15 min antes), não influenciou as respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1 (10 pmol/pata) (Figura 5).

Os resultados dispostos na Figura 5D indicam que não houve alteração significativa da atividade da mieloperoxidase aos 15, 30, 60 ou 120 min após a administração *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). Contudo, a injeção *i.pl.* de carragenina (300 µg) aumentou de modo pronunciado a atividade da enzima aos 120 min após sua injeção, resultado que serve como controle positivo para o ensaio enzimático.

#### **4.2.3 - Envolvimento de distintos mediadores pró-inflamatórios e opióides**

##### **4.2.3.1 - Aminas vasoativas**

Quando os animais receberam tratamento prévio (30 min) com o antagonista de receptores H<sub>1</sub> para histamina, pirilamina, por via sistêmica ou local, observou-se uma inibição dos efeitos nociceptivo (Figura 6A), hiperalgésico (Figura 6B) e edematogênico (Figura 6C). A porcentagem de inibição causada pela pirilamina administrada sistemicamente em relação às respostas induzidas pela ET-1 foi de

**Tabela 1** – Influência do tratamento prévio local com BQ-123 e BQ-788 sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzida pela injeção *i.pl.* de composto 48/80 em camundongos.

Tratamento	Dose ( <i>i.pl.</i> )	Nocicepção <sup>1</sup>	Hiperalgesia <sup>2</sup>	Edema <sup>3</sup>
		Tempo de lambida (s)	Tempo de lambida (s)	Δ Peso das patas (mg)
Salina + veículo	-	14,1±2,0	33,0±2,4	50,4±2,7
+ BQ-123	1 nmol	11,9±1,9	36,7±2,9	46,2±2,8
+ BQ-123	3 nmol	10,8±2,2	33,3±2,6	50,0±2,9
C 48/80 + veículo	0,3 µg	38,9±3,4*	53,7±5,0*	97,0±3,4*
+ BQ-123	1 nmol	39,5±7,1*	48,2±3,6*	91,1±5,5*
+ BQ-123	3 nmol	32,6±3,8*	37,7±2,9 <sup>#</sup>	90,0±4,9*
Salina + veículo	-	8,9±1,8	30,7±2,2	46,0±2,3
+ BQ-788	1 nmol	11,7±1,9	33,1±2,7	41,8±4,5
+ BQ-788	3 nmol	12,0±1,8	28,9±0,1	54,4±2,8
C 48/80 + veículo	0,3 µg	48,8±7,0*	49,7±4,9*	85,78±2,2*
+ BQ-788	1 nmol	35,4±8,4*	42,5±4,5*	78,11±4,6*
+ BQ-788	3 nmol	39,1±5,2*	44,1±4,6*	77,44±2,4*

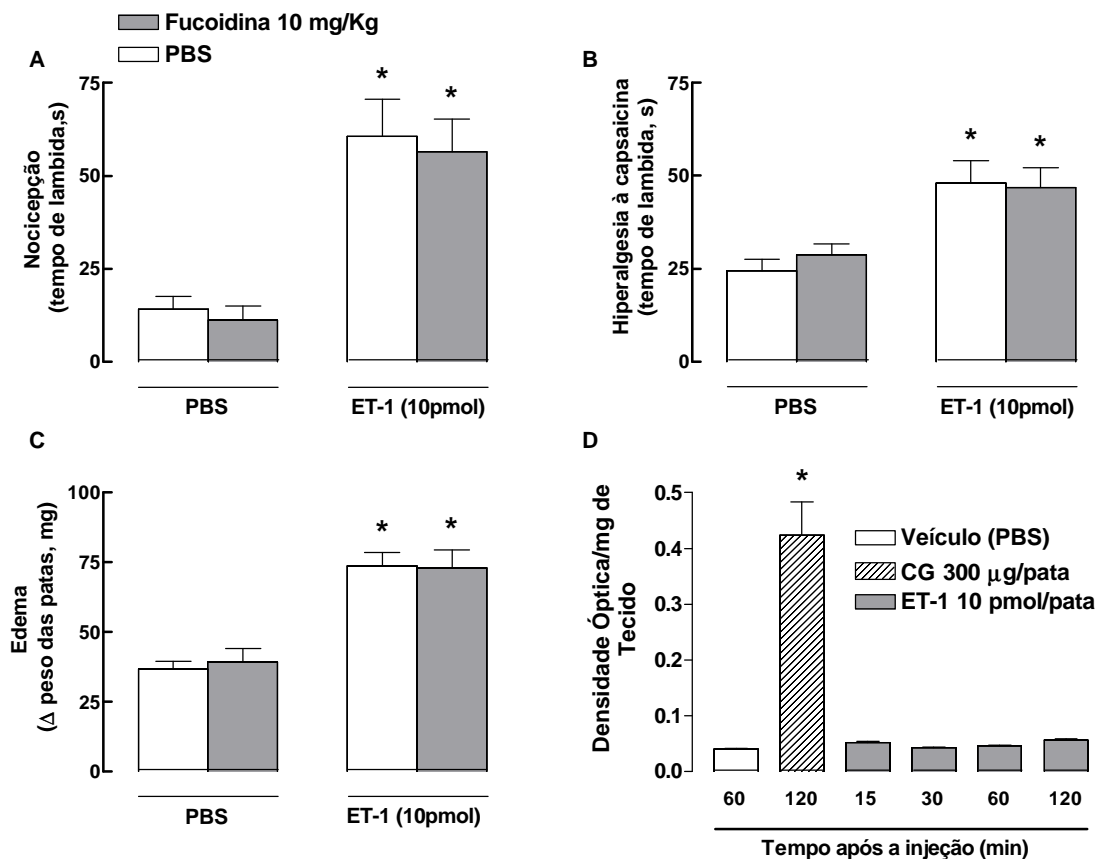
<sup>1</sup>Resposta nociceptiva do composto 48/80 (C 48/80 ou salina) mensurada nos 30 primeiros min após a injeção.

<sup>2</sup>Hiperalgesia foi avaliada como a capacidade de potencializar a resposta nociceptiva induzida por capsaicina (0,1 µg; *i.pl.*, 30 min após o C 48/80 ou salina).

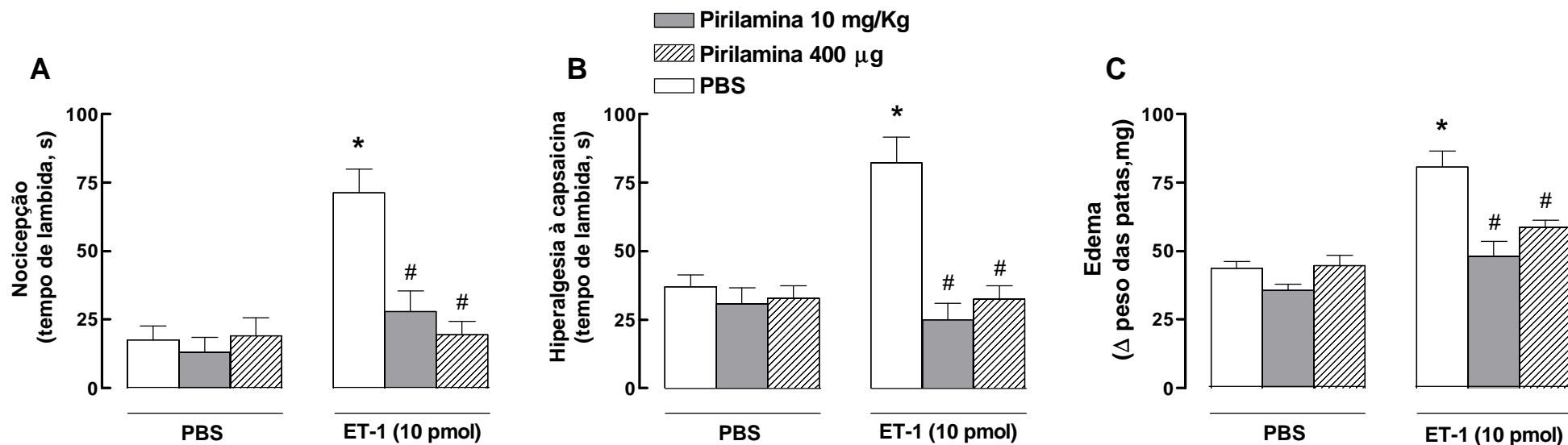
<sup>3</sup>O edema foi avaliado pela diferença de peso entre a pata ipsilateral e a pata não-treated (35 min após à injeção de composto 48/80).

\* e # indicam  $P < 0,05$  relativo ao respectivo controle, salina + veículo ou C 48/80 + veículo, respectivamente (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).





**Figura 5** – Efeito do tratamento sistêmico com fucoidina (*i.v.*, 15 min) sobre as respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada, durante 30 minutos após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgesia, após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g), foi mensurada durante 5 min (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). O painel D representa a atividade da mieloperoxidase, avaliada nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min após a injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol), 60 min após a administração de PBS e 120 min após a injeção *i.pl.* de Carragenina (CG; 300  $\mu$ g/pata). Os valores representam respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo, para os painéis A, B e C e 3 camundongos para o painel D. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 6** – Efeito do pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores  $H_1$  para histamina, pirilamina, sistemicamente (10 mg/Kg, 30 min) e localmente (400  $\mu$ g, co-administrada) sobre as respostas induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1 (10pmol). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada em 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgisia foi mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam as respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS e #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle para a ET-1 (ANOVA seguido de Bonferroni).

72, 100 e 65%, respectivamente. Já a porcentagem de inibição do antagonista H<sub>1</sub> para histamina, injetada por via *i.pl.* foi de 99, 100 e 62%, para os três efeitos, respectivamente.

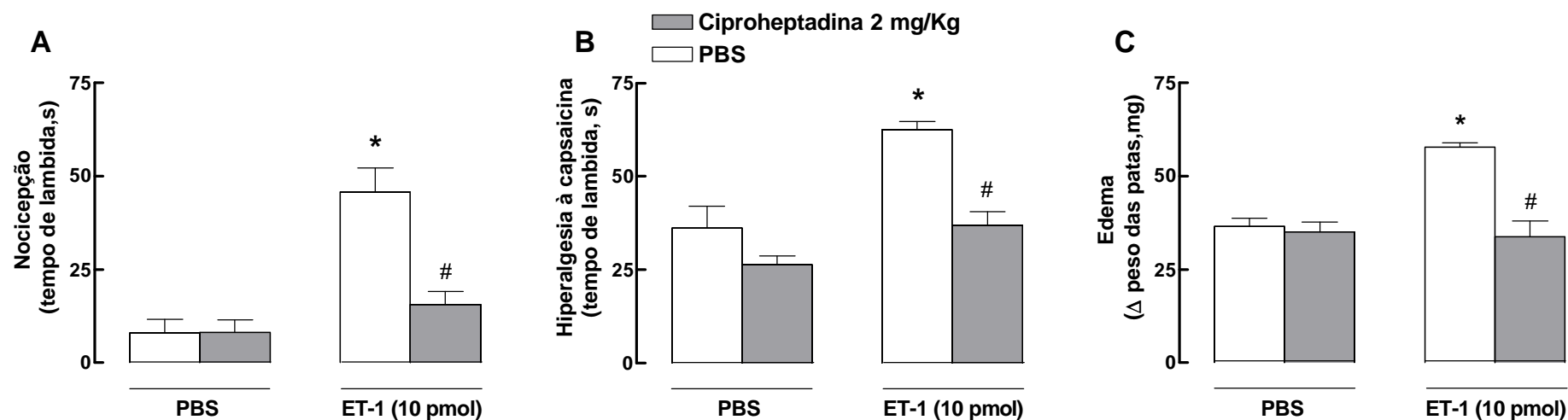
Outro grupo experimental foi tratado sistemicamente (30 min antes) com o antagonista não seletivo de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos, ciproheptadina (2 mg/Kg). A exemplo do observado com a pirilamina, verificou-se que a ciproheptadina também foi capaz de abolir as respostas nociceptivas (Figura 7A), hiperalgésicas (Figura 7B) e edematogênicas (Figura 7C), induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). A porcentagem de inibição causada pela ciproheptadina em relação aos efeitos da ET-1 foi de 80% para a nocicepção, 60% para a hiperalgesia e 100% para o edema.

A administração simultânea da metisergida (30 nmol), um antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub> com a ET-1 inibiu a hiperalgesia induzida pelo peptídeo (Figura 8B), em aproximadamente 80%. Porém, esse tratamento não afetou as demais respostas estudadas, ou seja a metisergida foi ineficaz em alterar a nocicepção (Figura 8A) e o edema (Figura 8C) causadas pela ET-1.

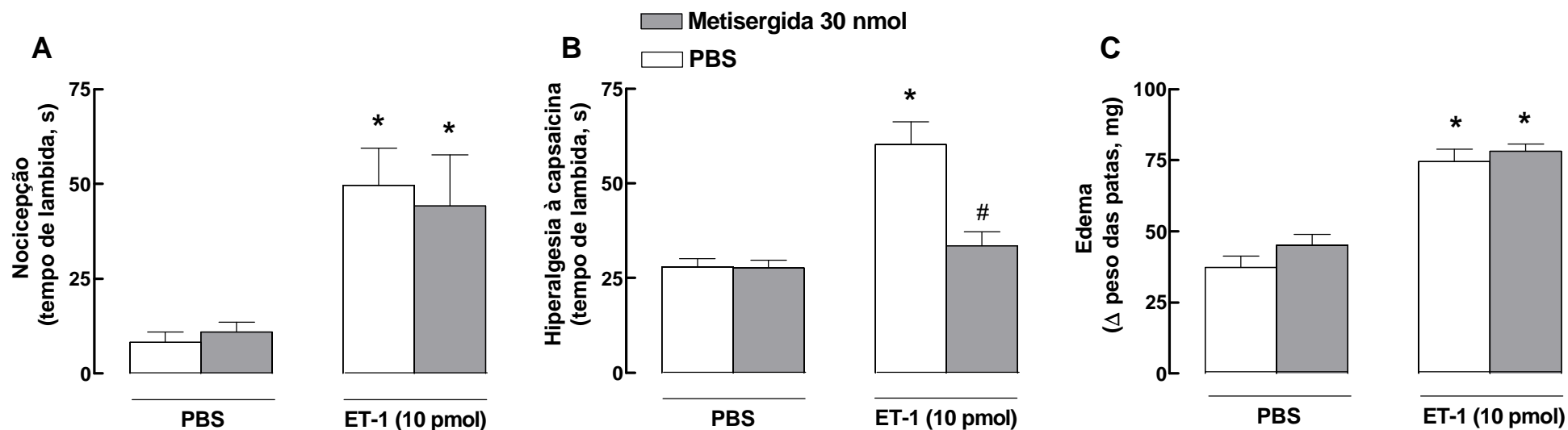
#### 4.2.3.2 - Eicosanóides derivados da via das ciclooxigenases e Leucotrieno B<sub>4</sub>

O tratamento prévio dos animais com a indometacina (3 mg/Kg, 60 min) ou com o ácido acetil salicílico (AAS – 10 e 30 mg/kg, 30 min) não se mostrou capaz de influenciar as respostas nociceptivas (Figuras 9A e 9D), hiperalgésicas (Figuras 9B e 9E) e edematogênicas (Figuras 9C e 9F) induzidas pela ET-1 na pata dos camundongos.

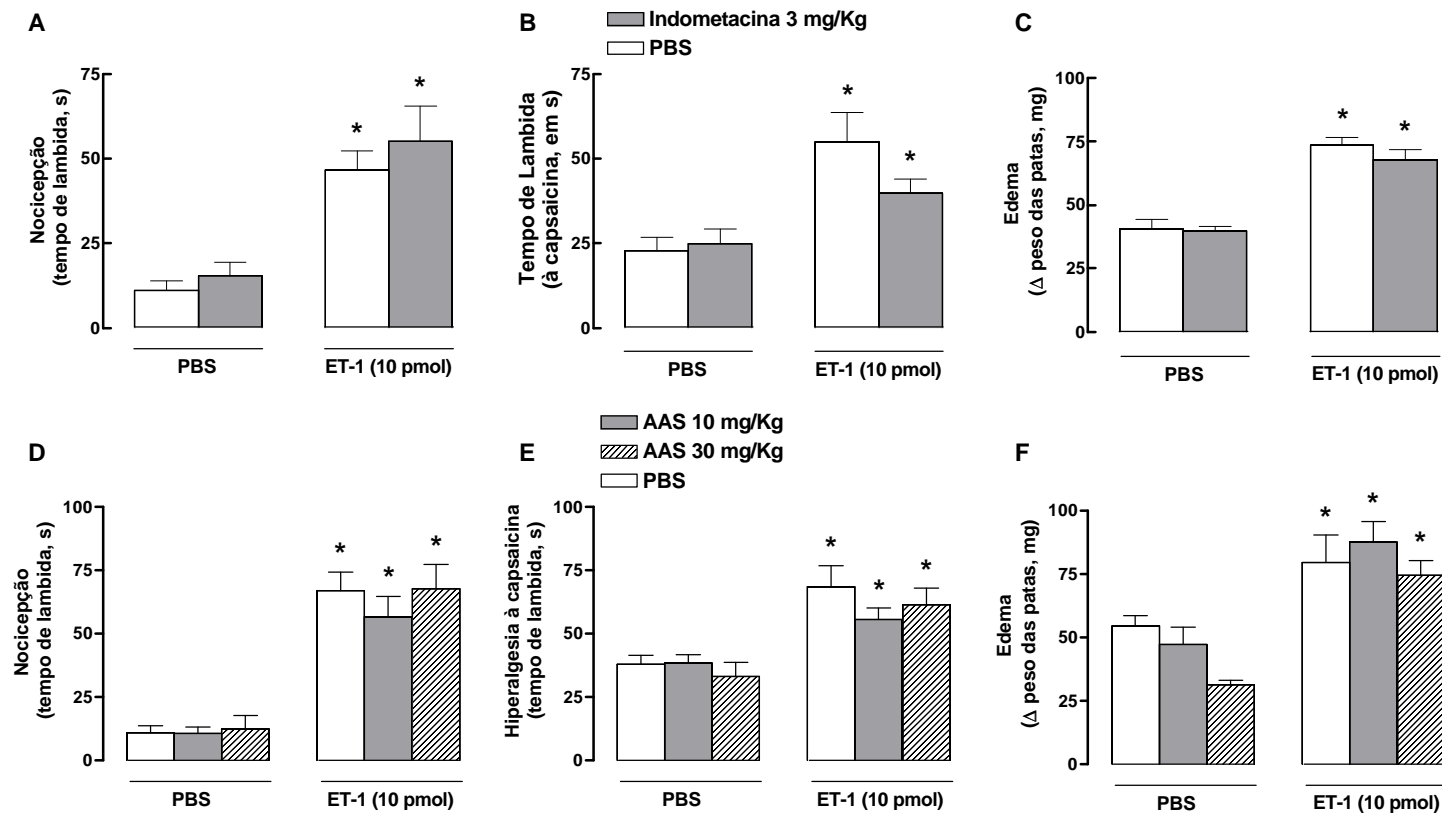




**Figura 7** – Efeitos da administração sistêmica (*i.p.*) do antagonista de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos, ciproheptadina (2 mg/Kg, 30 min) sobre as respostas induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1 (10pmol/pata). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada, durante 30 min, após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgisia foi mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1 µg) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS e #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle para a ET-1 (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 8** – Influência da co-administração do antagonista de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub> para serotonina, metisergida (30 nmol) sobre as respostas induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). A nociceção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada em 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgesia foi mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1 µg) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam respostas médias (± E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \*p < 0,05 quando comparado ao controle PBS e # p < 0,05 quando comparado ao controle para a ET-1 (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 9** – Influência do pré-tratamento sistêmico (*i.p.*) dos animais com os inibidores da ciclooxigenase (COX), indometacina (3 mg/Kg, 60 min) e ácido acetil salicílico (AAS – 10 e 30 mg/Kg, 30 min), sobre os efeitos induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada durante 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A e D). A hiperalgisia foi medida após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g), durante 5 min (painel B e E) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C e F). Os valores representam respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \*p < 0,05 quando comparado ao controle PBS (ANOVA seguido de Bonferroni).

Como pode ser visualizado na Tabela 2, os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos, também não foram alterados pelo pré-tratamento sistêmico (s.c.) com o antagonista de receptores LTB<sub>4</sub> para leucotrienos, o CP 105696, pelo menos na dose utilizada neste estudo (3 mg/Kg).

#### 4.2.3.3 - Bradicinina, óxido nítrico e PAF

A Tabela 2 demonstra também a influência do sistema de cininas sobre as respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). Assim, o pré-tratamento com o inibidor de cininase II, captopril (10 mg/Kg, *i.p.*), 1 h antes da administração de ET-1, não foi capaz de alterar as respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 na pata traseira de camundongos. Da mesma forma, o tratamento sistêmico com o antagonista de receptores B<sub>2</sub> para bradicinina, HOE-140 (50 nmol/Kg, s.c., 1 h antes) não influenciou a nocicepção, hiperalgesia ou o edema de pata induzidos pelo peptídeo.

O pré-tratamento sistêmico com UK 74505 (1 mg/Kg, *i.v.*, 15 min), antagonista de receptores para o fator de ativação plaquetária (PAF) ou a co-administração de L-NOARG (1,4 µmol/pata), um inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) não causou alterações significativas nas respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1 (10 pmol) em camundongos (Tabela 2).



**Tabela 2** – Influência do pré-tratamento com captopril, HOE-140, CP-105696, UK-74530 e L-NOARG sobre a nocicepção, hiperalgesia e edema induzida pela injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos.

Tratamento	Dose e via	Nocicepção <sup>1</sup>	Hiperalgesia <sup>2</sup>	Edema <sup>3</sup>
		Tempo de lambida (s)	Tempo de lambida (s)	Peso das patas (mg)
Salina + veiculo	-	19,8 ± 3,3	30,4 ± 3,5	38,85 ± 2,6
+ Captopril	10 mg/kg, <i>i.p.</i>	18,6 ± 3,0	42,8 ± 5,1	37,7 ± 1,3
+ HOE-140	50 nmol/kg, <i>s.c.</i>	23,3 ± 5,4	34,1 ± 3,9	31,8 ± 2,7
+ CP-105696	3 mg/kg, <i>s.c.</i>	22,4 ± 5,3	28,8 ± 4,2	45,8 ± 4,7
+ UK-74530	1 mg/kg, <i>i.v.</i>	19,6 ± 4,2	31,7 ± 1,4	37,4 ± 2,5
+ L-NOARG	1.4 µg, <i>i.pl.</i>	13,6 ± 2,3	36,3 ± 2,2	53,5 ± 6,6
ET-1 + veiculo	10 pmol, <i>i.pl.</i>	72,6 ± 12,3*	62,5 ± 4,3*	75,8 ± 2,5*
+ Captopril	10 mg/kg, <i>i.p.</i>	57,0 ± 9,4*	55,9 ± 7,4*	67,5 ± 2,3*
+ HOE-140	50 nmol/kg, <i>s.c.</i>	74,5 ± 14,3*	59,7 ± 7,2*	74,2 ± 1,4*
+ CP-105696	3 mg/kg, <i>s.c.</i>	57,0 ± 5,3*	50,4 ± 6,4*	76,7 ± 3,0*
+ UK-74530	1 mg/kg, <i>i.v.</i>	72,1 ± 18,7*	73,5 ± 10,4*	78,5 ± 7,5*
+ L-NOARG	1.4 µg, <i>i.pl.</i>	60,3 ± 12,3*	65,8 ± 5,9*	75,0 ± 4,9*

<sup>1</sup>Resposta nociceptiva da ET-1 (ou salina) medida nos 30 primeiros min após a injeção,

<sup>2</sup>Hiperalgesia foi avaliada como a capacidade de potencializar a resposta nociceptiva induzida por capsaicina (0,1 µg; *i.pl.*, 30 min após a ET-1 ou salina),

<sup>3</sup>O edema foi avaliado pela diferença de peso entre a pata ipsilateral e a pata não-tratada (35 min após à injeção da ET-1).

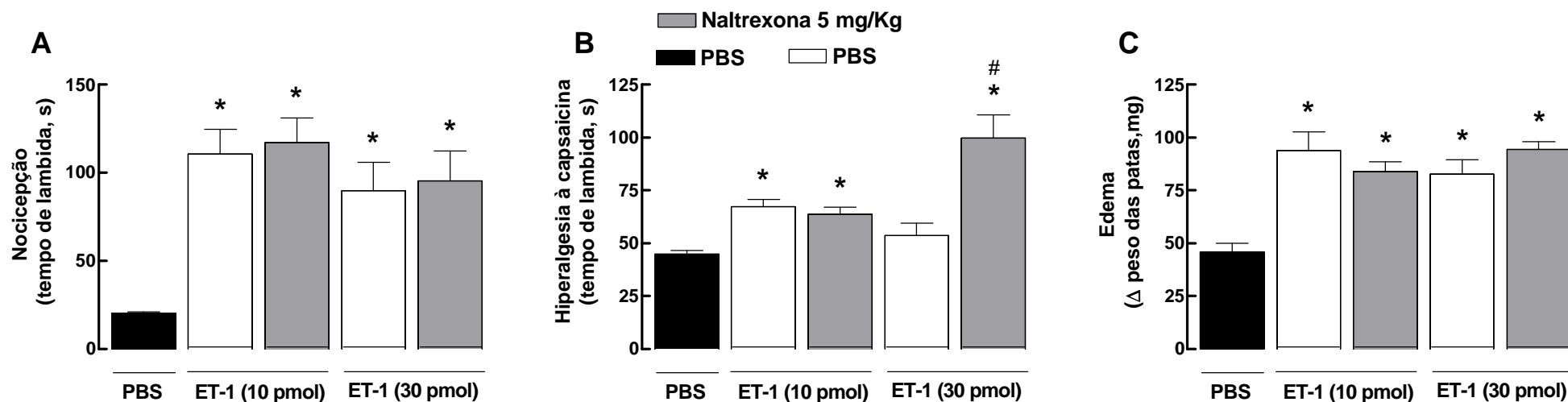
\* e # indicam P < 0,05 relativo ao respectivo controle, salina + veiculo ou ET-1 + veiculo, respectivamente (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).

#### 4.2.3.4 - Participação de opióides endógenos

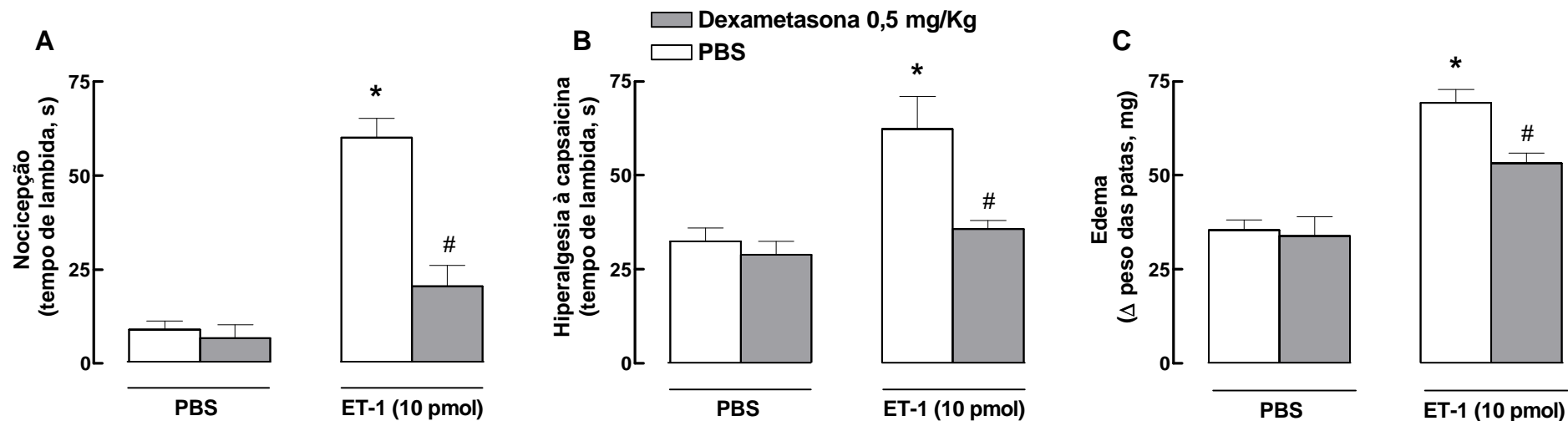
A Figura 10 demonstra que o pré-tratamento (30 min, via *i.p.*) com o antagonista não seletivo de receptores opióides, naltrexona, não alterou as respostas nociceptiva (Figura 10A), hiperalgésica (Figura 10B) ou edematogênica (Figura 10C) induzidas pela administração *i. pl.* de 10 pmol de ET-1. Quando testou-se a influência do antagonista opióide contra os efeitos causados por 30 pmol de ET-1, uma dose que induz respostas nociceptiva e edematogênica, mas é ineficaz em causar um efeito hiperalgésico, verificou-se que a naltrexona não alterou os efeitos nociceptivo ou edematogênico (Figura 10A e 10C), mas desmascarou uma resposta hiperalgésica marcante ao peptídeo (Figura 10B).

#### 4.2.3.5 - Modulação por Glicocorticóides

O glicocorticóide dexametasona, administrado por via *s.c.* 4 h antes da injeção de ET-1 (10 pmol) na pata de camundongos, proporcionou efeitos inibitórios sobre a nocicepção (Figura 11A), a hiperalgesia (Figura 11B) e o edema (Figura 11C) induzidos pelo peptídeo. A porcentagem de inibição do glicocorticóide em relação à ET-1 foi de 75, 77 e 45% para a nocicepção, hiperalgesia e edema, respectivamente.



**Figura 10** – Efeitos da administração sistêmica (*i.p.*) do antagonista não seletivo de receptores opióides, naltrexona (5 mg/Kg, 30 min) sobre as respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 e 30 pmol). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada, durante 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgisia, após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g), foi mensurada durante 5 min (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle PBS e #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle para a ET-1 (ANOVA seguido de Bonferroni).



**Figura 11** – Influência do pré-tratamento dos animais (4 h) com o glicocorticoide dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c.), sobre as respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 (10 pmol). A nocicepção foi avaliada pelo tempo total despendido lambendo a pata tratada em 30 min após a administração *i.pl.* de ET-1 ou PBS (painel A). A hiperalgisia mensurada durante 5 min após a administração ipsilateral de capsaicina (0,1  $\mu$ g) (painel B) e o edema avaliado pela diferença de peso entre as patas (painel C). Os valores representam respostas médias ( $\pm$  E.P.M.) de 6 a 8 camundongos em cada grupo. \*p e # p < 0,05 quando comparado ao controle PBS e para a ET-1, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).



## 5. Discussão

---

Múltiplos mecanismos celulares e moleculares operam sozinhos e/ou em combinação no SNC e/ou no periférico para induzir diferentes formas de dor (Scholz and Woolf, 2002). Diversos mediadores liberados localmente no sítio do dano ou doença, são provavelmente fatores-chaves na geração, manutenção e modulação da dor (Julius & Basbaum, 2001). Um dos mediadores que está implicado na patogênese da dor e associado com estados isquêmicos, inflamação e câncer é o potente peptídeo vasoativo ET-1.

Estudos anteriores sugerem que as ETs estão envolvidas na nocicepção e inflamação tanto em animais como em humanos (Ferreira *et al.*, 1989; Dahlof *et al.*, 1990, Hammerman *et al.*, 1997, Piovezan *et al.*, 1997, 2000; Carducci *et al.*, 1998; Davar *et al.*, 1998, De-Melo *et al.*, 1998; Graido-Gonzalez *et al.*, 1998; Fareed *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2000). A ET-1 é encontrada em altas concentrações em neurônios do GRD (Giaid *et al.*, 1989) e células satélites (Kar *et al.*, 1991). Receptores endotelinérgicos do tipo ET<sub>A</sub> são encontrados em neurônios de tamanho intermediário no GRD e em seus axônios (Pomonis *et al.*, 2001). Além disso, a administração intraperitoneal de ET-1 em roedores produz um comportamento de dor (Raffa *et al.*, 1996 a, b), enquanto a injeção intra-articular deste peptídeo induz nocicepção e hiperalgesia em cães e ratos (Ferreira *et al.*, 1989; De-Melo *et al.*, 1998). De forma similar, em camundongos, a injeção intraplantar (*i.pl.*) de ET-1 potencializa a dor em modelos químicos e inflamatórios que induzem nocicepção (Piovezan *et al.*, 1997; Menéndez *et al.*, 2003). Em humanos, a injeção na artéria braquial é capaz de provocar dor severa e prolongada e alodínia ao toque (Dahlof *et*

*al.*, 1990). Estas e outras evidências suportam o papel potencial da ET-1 na sinalização da dor.

Os dados apresentados neste estudo confirmam e aprofundam o envolvimento das ETs em quadros de dor, bem como investiga alguns dos mediadores envolvidos nas respostas nociceptiva, hiperalgética e edematogênica induzidas pela administração *i.pl.*) deste peptídeo em camundongos. Nossos resultados reproduzem os descritos por Piovezan *et al.* (2000), em que a ET-1 quando administrada na pata de camundongos induz *per se* um comportamento nociceptivo que é avaliado pelo tempo em que cada animal despendeu lambendo e/ou mordendo a pata tratada. A ET-1 induz também um efeito hiperalgésico, potencializando a resposta nociceptiva deflagrada por administração *i.pl.* de capsaicina. Além disso, o peptídeo promove edema, avaliado pelo aumento do volume da pata tratada (ipsilateral) comparando à pata não-tratada.

Nossos resultados demonstraram que a aplicação *i.pl.* do composto 48/80, nas doses utilizadas neste estudo, induz um perfil de efeitos muito semelhante ao da ET-1 em camundongos. Ou seja, o degranulador de mastócitos causou um comportamento de nocicepção *per se*, aumentou as respostas de lambida e/ou mordida à capsaicina (hiperalgesia) e induziu edema. Isto sugere que a degranulação de mastócitos locais e conseqüente liberação de mediadores pode ser responsável pelas respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas pela injeção *i.pl.* do composto 48/80. Como mencionado anteriormente, os mastócitos podem sintetizar diversos mediadores que estão envolvidos nos processos de dor e inflamação. Alguns destes mediadores, incluindo a histamina,



serotonina, proteases específicas e TNF- $\alpha$ , são liberados de estoques intracelulares, enquanto outros mediadores, como os eicosanóides, são sintetizados após ativação. Também ocorre a síntese *de novo* de diversas citocinas, quimiocinas e TNF- $\alpha$  após ativação de um programa específico de expressão gênica.

Com o objetivo de dessensibilizar os mastócitos residentes na pata de camundongos, os animais foram tratados com injeções locais diárias do composto 48/80. No quinto dia, os animais receberam uma injeção *i.pl.* do degranulador de mastócitos e suas respostas foram analisadas. Observou-se então que as respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica ao composto 48/80 foram completamente abolidas, evidenciado que os efeitos induzidos pela administração *i.pl.* do agente dependem da presença de mastócitos locais. Nossos resultados também demonstraram que injeções locais diárias do degranulador de mastócitos também aboliram completamente os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico, observados após a injeção *i.pl.* da ET-1. Tais resultados sugerem que mastócitos residentes são fundamentais para que o peptídeo induza estas respostas quando injetado localmente na pata de camundongos.

O composto 48/80 é uma poliamina catiônica sintética que degranula mastócitos por uma ativação direta de subunidades  $\alpha$  de proteínas  $G_{i/o}$ . Outros peptídeos contendo aminoácidos catiônicos podem apresentar o mesmo perfil, como a substância P e as cininas (para revisão ver Mousli *et al.*, 1990, Hall & Morton, 1997). Apesar da ET-1 apresentar resíduos de cisteína que lhe conferem um perfil catiônico, esse peptídeo não parece atuar diretamente sobre os mastócitos pelo mesmo mecanismo, pois o tratamento prévio com o antagonista de receptores ET<sub>A</sub>, BQ-123 reduz de forma

marcante, os comportamentos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos (Piovezan *et al.*, 2000). Estudos anteriores demonstram que mastócitos derivados da medula óssea de camundongos, apresentam receptores do tipo ET<sub>A</sub> sobre sua superfície, e o estímulo com ET-1 induz a liberação de histamina e leucotrieno C<sub>4</sub> (Yamamura *et al.*, 1994). Então pode-se sugerir que a ET-1 quando injetada *i.pl.* em camundongos, ativa mastócitos via receptores de membrana ET<sub>A</sub>. Estas células sofrem degranulação e liberam diversos mediadores que ativam receptores específicos para induzirem nocicepção, hiperalgesia e edema. Para confirmar a participação efetiva e indispensável dos mastócitos, poderia ter sido utilizado o cromoglicato de sódio. Esta substância, apesar de não ter sido utilizada neste estudo, tem sido amplamente utilizada como estabilizadora de mastócitos em modelos experimentais e no tratamento de doenças alérgicas (Shapiro and Koning, 1985; Patalano e Ruggieri, 1989). Em recente estudo realizado em nosso laboratório, verificou-se que a sensibilização de camundongos com ovalbumina (OVA) e posterior tratamento com a mesma substância, induz um comportamento nociceptivo. Esta resposta parece depender importantemente da degranulação de mastócitos, mediada via imunoglobulina E (IgE). A depleção de mastócitos por injeções diárias de composto 48/80, reduziu a nocicepção induzida por OVA (Piovezan *et al.*, 2004). O mesmo ocorre em relação às respostas induzidas pela injeção *i.pl.* de ET-1 no presente estudo. Em conjunto com os resultados apresentados no presente trabalho, pode-se sugerir que os mastócitos são muito importantes na patogenia da dor e inflamação.

Sob condições fisiológicas, os mastócitos da pele estão localizados preferencialmente ao redor dos nervos, vasos sanguíneos e folículos capilares (Ehrlich, 1878). Esta observação relatada originalmente por Paul Ehrlich, intuitivamente sugere que estes enigmáticos e multifacetados protagonistas da imunidade natural são funcionalmente relevantes para muito mais aspectos da fisiologia que somente na geração de respostas inflamatórias e vasodilatadoras, dependente da interação antígeno/IgE (Maurer *et al.*, 2003). Muitas outras ações estão sendo atribuídas aos mastócitos desde sua descoberta. Com estas e outras observações, surgiu o termo neuroimunologia (Gottwald *et al.*, 1998). Desta forma, muitos argumentos sugerem que mastócitos e nervos sensoriais sejam designados como uma unidade funcional, apesar de suas origens e distribuições distintas (Maurer *et al.*, 2003). Entretanto, mastócitos e nervos sensoriais compartilham diversos sinais ativadores e ambas as células expressam seus receptores (i.e. vanilóides) (Biro *et al.*, 1998). Ambos respondem ao estímulo de mediadores, muitos dos quais produzidos por eles mesmos (i.e. NGF, neuropeptídeos, ET-1). Os mastócitos estão localizados no interior de nervos sensoriais (Johnson *et al.*, 1991; Sugiura *et al.*, 1992) ou são co-localizados (Botchkarev *et al.*, 1997). Além disso, os mastócitos podem ser ativados por produtos de nervos sensoriais como substância P (Paus *et al.*, 1995) e ET-1 (Metz *et al.*, 2001). Muitos mediadores derivados de mastócitos, incluindo serotonina (Carlton *et al.*, 1997) e triptase (Steinhoff *et al.*, 2000) podem ativar nervos sensoriais, enquanto a histamina pode regular positiva ou negativamente a atividade destes nervos, dependendo de quais receptores histaminérgicos são ativados (Hua & Yaksh, 1993; Ohkubo *et al.*, 1995). Todos estes

dados sugerem que a interação entre mastócitos e nervos sensoriais é de crucial importância na gênese e processamento da dor e da inflamação.

Além da ET-1 ter a capacidade de ativar mastócitos, estas células também são capazes de gerar e liberar o peptídeo (Liu *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 2000). Os resultados do presente estudo demonstram que o bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (pelo tratamento prévio com BQ-123 e BQ-788, respectivamente), não influenciou os efeitos nociceptivo e edematogênico induzidos pela injeção *i.pl.* do composto 48/80. No entanto, sua capacidade de potencializar a nocicepção induzida por capsaicina foi reduzida pelo BQ-123. Sendo assim, a hiperalgesia causada pela degranulação de mastócitos parece depender da mobilização de ETs endógenas e ativação de mecanismos operados por receptores ET<sub>A</sub>. Estudos sugerem que os receptores ET<sub>A</sub> podem estar envolvidos nas respostas nociceptiva e inflamatória induzidas pelas ETs endógenas. A sensibilização de camundongos com OVA e posterior tratamento com a mesma substância, induz um comportamento nociceptivo. Este comportamento é bloqueado pelo tratamento prévio sistêmico com o antagonista misto ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> ou local com o antagonista seletivo para receptores ET<sub>A</sub>. O mesmo não ocorreu quando antagonistas seletivos para receptores ET<sub>B</sub> são administrados (Piovezan *et al.*, 2004). Além disso, camundongos sensibilizados com OVA também desenvolvem edema de pata que é reduzido pelo tratamento com antagonistas seletivos de receptores ET<sub>A</sub> (Sampaio *et al.*, 1995). O antagonismo de receptores ET<sub>A</sub> também é capaz de aliviar a alodínia mecânica associada com diabetes em ratos (Jarvis *et al.*, 2000) e reduzir a nocicepção em camundongos em um modelo experimental de câncer (Wacnik *et al.*, 2001).

No processo inflamatório também ocorre migração de células: os neutrófilos são as principais células envolvidas na fase aguda, enquanto monócitos/macrófagos e alguns tipos de linfócitos são as principais células recrutadas nas fases tardias da inflamação (Huerre e Gounon, 1996). A degranulação de mastócitos parece ter a capacidade de recrutar ao menos dois tipos de leucócitos, os neutrófilos e os monócitos. Os mediadores liberados pelos mastócitos podem contribuir para o rolamento dos leucócitos sobre as paredes dos vasos e subseqüentemente para sua adesão (Kubes and Grange, 1996). Embora os mastócitos sejam fundamentais na mediação dos efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico induzidos pela injeção *i.pl.* de ET-1, os neutrófilos parecem não ser importantes como mediadores destes efeitos. A administração do inibidor de selectinas P e E, fucoidina, não alterou nenhuma das três respostas à ET-1 avaliadas. As selectinas são polissacarídeos necessários para a adesão de células inflamatórias (especialmente neutrófilos) às células endoteliais e portanto para sua posterior migração para o sítio de lesão (Teixeira & Hellewell, 1997). Além disso, a dosagem da enzima mieloperoxidase, que serve como parâmetro para a avaliação indireta do recrutamento de neutrófilos (Schneider e Issekutz, 1996), não sofreu alteração até 120 min após a administração do peptídeo. Estes dados corroboram os obtidos por Sampaio *et al.*, (2000) no modelo de pleurisia induzida por estímulos inflamatórios em camundongos. Estes autores sugeriram que as ETs ativando receptores ET<sub>A</sub> são fundamentais para que ocorra um acúmulo tardio (24 h) de eosinófilos e neutrófilos, embora não sejam importantes na resposta neutrofílica aguda (4 h). Outro estudo, envolvendo hiperalgesia e inflamação induzidas por lesão no nervo ciático, demonstrou que os neutrófilos são visualizados somente após 3 h e que estas células migram para o

sítio do dano, atingindo uma densidade máxima após 12 h (Zuo *et al.*, 2003). Os autores sugeriram que a histamina liberada por mastócitos contribui para o recrutamento de neutrófilos e para o desenvolvimento de hiperalgisia tardia. Como não foi analisada no presente estudo a atividade da mieloperoxidase em períodos maiores que 120 min após a administração *i.pl.* de ET-1, os resultados obtidos não descartam a possibilidade de haver uma migração de neutrófilos, tardiamente para o local da injeção. Além de neutrófilos, futuras investigações serão necessárias para avaliar se ocorre a migração tardia de monócitos/macrófagos para o sítio das lesões. Essa migração de monócitos/macrófagos posterior à migração de neutrófilos ocorre possivelmente porque os fatores envolvidos no recrutamento de macrófagos são liberados a partir de neutrófilos (Scapini *et al.*, 2000).

A partir das observações de que mastócitos, mas não neutrófilos, são fundamentais para que ocorra a indução de respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica após a administração *i.pl.* de ET-1 em camundongos, procurou-se identificar quais os mediadores liberados por mastócitos, poderiam estar envolvidos nestes processos. Nossos resultados demonstram que a administração de um antagonista H<sub>1</sub> para histamina, tanto local quanto sistemicamente, abole os três efeitos observados neste modelo experimental. Assim, a histamina liberada a partir da degranulação de mastócitos, ativando receptores H<sub>1</sub>, parece ser fundamental para que ocorram tanto a nocicepção, quanto a hiperalgisia e o edema induzidos pela ET-1. Outro mediador investigado foi a serotonina. Para isso, utilizou-se a metisergida, um antagonista não seletivo para receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>7</sub>. Esta substância não foi capaz de influenciar a nocicepção ou o edema induzidos pela

injeção de ET-1, mas aboliu a hiperalgesia à capsaicina. Um estudo envolvendo hiperalgesia térmica induzida por substâncias indutoras de alergia em ratos, demonstrou que a histamina, serotonina e bradicinina parecem atuar de forma sinérgica na mediação deste fenômeno. A hiperalgesia térmica neste modelo é sensivelmente bloqueada por antagonistas de receptores para histamina, serotonina ou bradicinina. Além disso, o bloqueio seletivo de receptores para apenas um desses agonistas é suficiente para abolir completamente a resposta hiperalgésica, indicando um sinergismo marcante entre os três mediadores (Lavich *et al.*, 2003). Neste sentido, nossos dados também suportam a recorrente sugestão de que há um forte e importante sinergismo entre histamina e serotonina em diversas condições inflamatórias (Gilfoil and Klavins, 1965; Parada *et al.*, 2001). Neste estudo, o sinergismo entre as aminas biogênicas pode ser evidenciado também pelo fato do antagonista não seletivo de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos, ciproheptadina, ter abolido completamente os três efeitos induzidos pela ET-1.

Conforme mencionado extensamente na Introdução, diversos eicosanóides sintetizados pela via da COX (i.e. prostanóides) desempenham papéis nociceptivos, hiperalgésicos e edematogênicos importantes na reação inflamatória (Vane e Botting, 1996; Vane *et al.*, 1998; Funk, 2001; MacMahon *et al.*, 2001). As ETs induzem a liberação de prostanóides em muitos órgãos e tecidos (De Nucci *et al.*, 1988; Touvay *et al.*, 1990; D'Orléans-Juste *et al.*, 1992). Estudos anteriores, utilizando inibidores da COX, produziram evidências contraditórias do envolvimento de prostanóides nos efeitos nociceptivos da ET-1. Embora Ferreira *et al.* (1989) tenham demonstrado que inibidores da COX são capazes de abolir a indução de contorções abdominais

induzidas pela ET-1, outro estudo relatou resultados discordantes com essa possibilidade (Raffa & Jacoby, 1991). Nossos resultados alinham-se aos do último estudo, ao demonstrar que dois inibidores não seletivos da COX, indometacina e AAS, foram inefetivos em alterar qualquer uma das três respostas induzidas pela administração *i.pl.* de ET-1. Diante destes achados, parece que prostanóides não estão envolvidos nas ações nociceptiva, hiperalgésica ou edematogênica causadas pela ET-1, ao menos neste modelo.

Algumas evidências adicionais coletadas no presente estudo parecem descartar o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico produzidas por vias alternativas à COX nestas ações da ET-1. Neste sentido, os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da ET-1 não foram influenciados pelo tratamento prévio com o antagonista de receptores para o PAF, UK 74505, ou dos receptores LTB para o LTB<sub>4</sub>, CP 105696. Embora o PAF e o leucotrieno B<sub>4</sub> não pareçam mediar algumas das respostas à ET-1, pelos menos nas doses e vias utilizadas neste estudo, ambos mediadores desempenham papéis pró-inflamatórios em diversas condições fisiopatológicas ( para revisão ver Ishii and Shimizu, 2000; Funk, 2001).

O óxido nítrico (NO) é gerado durante respostas inflamatórias e imune (para revisão ver Moncada et al., 1991; Lincoln et al., 1997). Diversos estudos indicam sua participação no desenvolvimento de edema, promovendo a dilatação e o aumento da permeabilidade de vasos da microcirculação (Davies et al., 1995; Omote et al., 2001). Além disso, o NO participa do processamento nociceptivo tanto central como periférico (Meller and Gebhart, 1993). No presente trabalho, o tratamento prévio local dos animais com L-NOARG, um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) que converte



a L-arginina em L-citrulina e NO (para revisão ver Coleman, 2001), não promoveu qualquer alteração nos comportamentos nociceptivo, hiperalgésico ou na indução de edema pela injeção i.pl. de ET-1. Isto sugere o NO não medeia os efeitos induzidos pela ET-1, pelo menos nas condições em que foi realizado o presente estudo.

Outros mediadores implicados nas respostas nociceptiva e inflamatória e avaliados no presente trabalho, são as cininas. Estes peptídeos têm sido amplamente estudados durante os últimos anos, e a cada dia descobre-se uma nova importância deste grupo de peptídeos em processos fisiopatológicos, especialmente na inflamação e na indução da nocicepção (para revisão ver Calixto et al., 2000). Resultados obtidos com estudos em modelos animais sugerem que os receptores  $B_2$  estão envolvidos na fase inicial das respostas inflamatórias e de nocicepção. Os receptores  $B_1$ , por sua vez, participam de fases mais tardias da inflamação e hiperalgesia (Dray, 1997; Campos et al., 1998; Ferreira et al., 2000). Desta forma, utilizamos o antagonista de receptores  $B_2$  para cininas, o HOE-140, visto que nosso modelo é observado em fases inflamatórias e nociceptivas iniciais. Este antagonista não alterou qualquer uma das respostas induzidas pela injeção i.pl. de ET-1, analisadas neste estudo. Sugere-se, portanto, que mecanismos operados por receptores  $B_2$  para cininas não estão implicadas nas respostas à injeção i.pl. de ET-1. Além disso utilizou-se um inibidor de cinases II, para aumentar a disponibilidade de cininas no local da aplicação de ET-1. Mesmo assim, não observou-se alterações nas respostas observadas neste estudo. Assim, verificou-se que neste modelo, o sistema de cininas parece não participar das respostas induzidas à aplicação i.pl. de ET-1 em camundongos, ao menos, nas concentrações e vias de administração utilizadas.

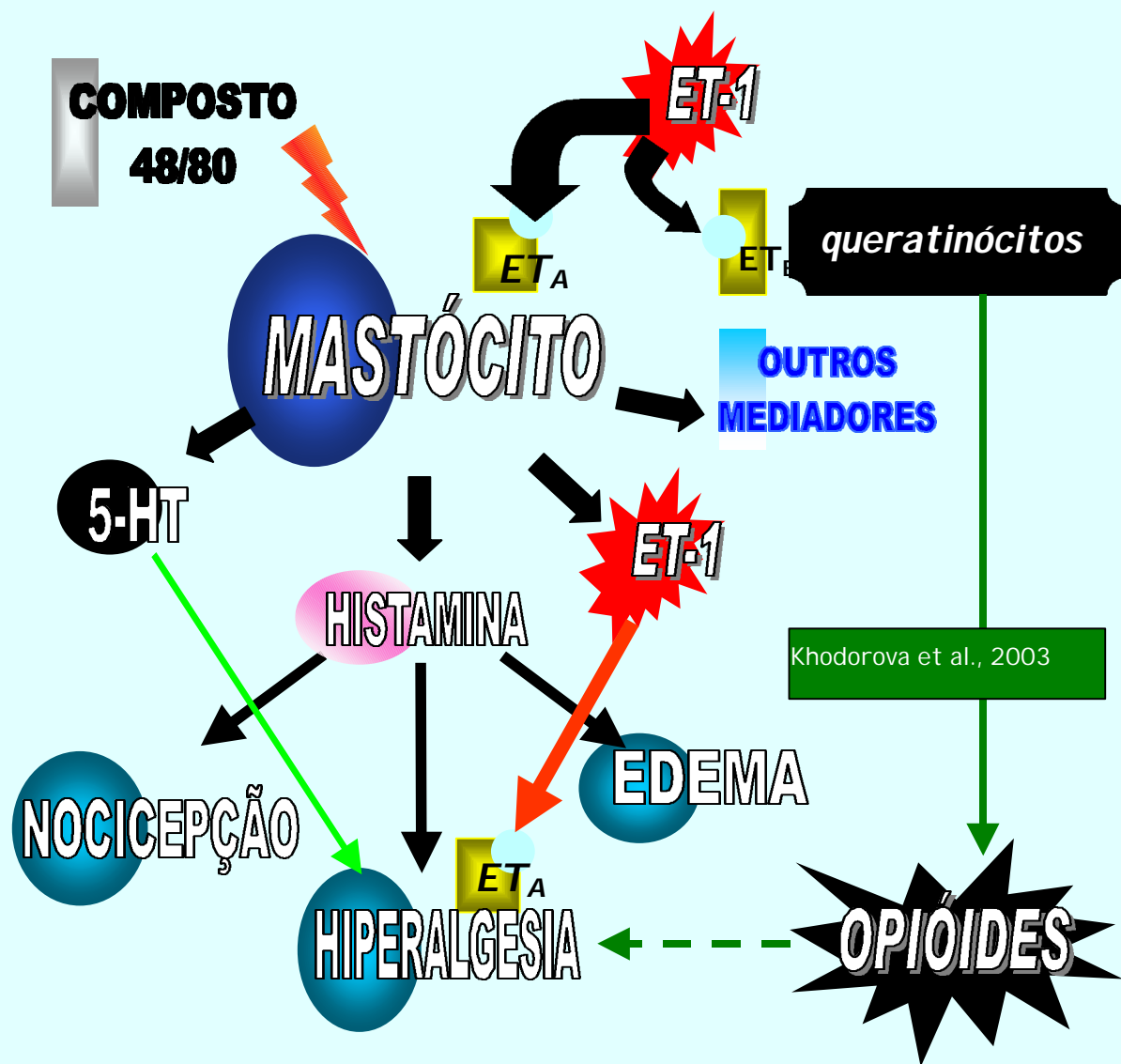
No estudo de Piovezan et al. (2000), quando administrada i.pl. em dose elevada (i.e. 30 pmol), a ET-1 mostrava-se incapaz de induzir uma resposta hiperalgésica à capsaicina, mas ainda causava comportamento nociceptivo, bem como edema da pata ipsilateral. Além disso, no mesmo trabalho, os autores observaram que o pré-tratamento com o antagonista de receptores ET<sub>B</sub> para endotelinas poderia desmascarar uma resposta hiperalgésica significativa a esta dose elevada de ET-1. A partir disto, sugeriu-se uma função antinociceptiva evocada pela ativação deste tipo de receptores endotelinérgicos. Por outro lado, Khodorova et al. (2003) demonstraram que IRL-1620 (um agonista seletivo para receptores ET<sub>B</sub>), inibe o comportamento de lambida de pata induzida por ET-1 na pata de ratos, por promover a liberação de  $\beta$ -endorfina a partir de queratinócitos. De fato, há amplas evidências de que opióides são capazes de causarem efeitos antinociceptivos por ações periféricas (Fields *et al.*, 1980; Stein, 1998; Machelska *et al.*, 1998).

No presente estudo, foi utilizado o antagonista não seletivo para receptores opióides naltrexona, para investigar se opióides endógenos poderiam influenciar tanto a hiperalgesia causada pela ET-1 na pata de camundongos, quanto as suas ações nociceptiva e edematogênica. Confirmando os dados de Piovezan et al. (2000), a ET-1 não acarretou hiperalgesia à capsaicina na dose de 30 pmol. Embora o tratamento prévio com a naltrexona tenha se mostrado ineficaz em alterar a nocicepção ou o edema induzidos por esta dose de ET-1, houve um nítido desmascaramento do efeito hiperalgésico do peptídeo à capsaicina. Tal fato sugere um envolvimento seletivo de mecanismos operados por receptores opióides localizados proximamente aos nociceptores contidos na pata, corroborando assim os

achados iniciais de Khodorova et al. (2003) em ratos. Permanece a ser melhor investigado se, a exemplo do que ocorre no rato, os opióides recrutados pela ET-1 em camundongo também provém de queratinócitos.

Também foi observado que o glicocorticóide dexametasona pode abolir completamente a nocicepção, a hiperalgesia e o edema causados pela injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos. Os glicocorticóides são agentes muito efetivos no controle da inflamação aguda e crônica por interferência com múltiplas vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória. Diversos genes são regulados negativamente pelos corticóides, incluindo àqueles que codificam para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, receptor para IL-2, molécula intracelular de adesão-1, fosfolipase A<sub>2</sub> e COX-2 (Goopelt-Struebe, 1997; Kawamura *et al.*, 2000). A ação inibitória da dexametasona, evidenciada no presente estudo, sugere que, além da histamina e serotonina derivadas de mastócitos, as citocinas podem contribuir como mediadoras dos processos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico causados pela administração de ET-1 na pata de camundongos.

Sendo assim, o presente estudo confirma que a injeção *i.pl.* de ET-1 induz um comportamento nociceptivo, hiperalgésico à estímulo químico, além de causar um pronunciado edema de pata. Além disso, identifica alguns possíveis mediadores envolvidos nestes processos. O esquema abaixo representa, os mediadores envolvidos na mediação destas respostas conforme os resultados do presente estudo.



**Esquema 2** – Representação esquemática da proposta dos mecanismos celulares e mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema induzidos pela injeção i.pl. de ET-1 em camundongos. A proposta é baseada nos resultados do presente estudo, juntamente com aqueles de Khodorova et al. (2003).

## 6. Conclusões

---

Os resultados do presente estudo indicam de modo geral que:

1. A endotelina-1 (ET-1) quando injetada na pata de camundongos induz um comportamento de nocicepção, hiperalgesia e edema.
2. Estes comportamentos dependem da ativação de receptores ET<sub>A</sub> que estão localizados na superfície de mastócitos. A degranulação de mastócitos libera diversos mediadores com propriedades pró inflamatórias entre estes a histamina que parece mediar as respostas nociceptiva, hiperalgésica e edematogênica induzidas por ET-1. Além da histamina, a serotonina também medeia a resposta hiperalgésica.
3. As ETs endógenas, liberadas por mastócitos ativados, também podem contribuir para a hiperalgesia à estímulo químico com capsaicina.
4. Outras células envolvidas nos processos inflamatórios, como os neutrófilos, não influenciam nenhum dos efeitos à injeção *i.pl.* de ET-1 em camundongos.
5. Mediadores como o PAF, eicosanóides, leucotrieno B<sub>4</sub>, NO, bradicinina também não são capazes de mediar as respostas nociceptiva, hiperalgésica ou edematogênica induzidas pela administração de ET-1 na pata de camundongos.
6. Os opióides podem estar envolvidos na ação antinociceptiva induzida pela estimulação de receptores endotelinérgicos do tipo ET<sub>B</sub> por doses mais elevadas do peptídeo.
7. Os glicocorticóides modulam os três efeitos induzidos pela administração *i.pl.* de ET-1 em camundongos.

## **7. Referências Bibliográficas**

---

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Med. Clin. North Am.**, 81:1-28, 1997.

APPLEQUIST, S. E.; WALLIN, R. P.; LJUNGGREN, H. G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. **Int. Immunol.**, 14:1065-1074, 2002.

ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348: 730-732, 1990.

ARRANG, J. M. Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. **Cell. Mol. Biol.**, 40: 275-281, 1994.

BABBEDGE, R. C.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Anti-nociceptive activity of nitric oxide synthase inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. **J. Pharm. Pharmacol.**, 45(1):77-9, 1993.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma. **Pharmacol. Rev.**, 40: 49-84, 1988.

BATTISTINI, B.; FILEP, J. G.; GRAGOE Jr, E. J.; FOURNIER, A.; SIROIS, P. A role for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in contraction guinea pig airways by endothelin-1 *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 175: 583-588, 1991.

BENOIST, C. and MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature**, 420: 19-26, 2002.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **J. Exp. Med.**, 136: 1356-77, 1972.

BENVENISTE, J.; TENCE, M.; VARENNE, P.; BIDAULT, J.; BOULLET, C.; POLONSKY, J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. **C. R. Seances Acad. Sci. D.**, 289:1037-40, 1979.

BERTELLI, A., CLERICO, A., CHICCA, A., GIOVANNINI, L., GORIO, A., ROMANO, M. A., 1992. Role of endothelin-1 in carrageenin-induced inflammation. **Int. J. Tissue React.**, 14, 225-230.

BESSON, J. M. and CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, 67: 67-185, 1987.

BESSON, J. M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs.**, 53 (Suppl. 2): 1-9, 1997.



BHOOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.

BIRO, T.; MAURER, M.; MODARRES, S.; LEWIN, N. E.; BRODIE, C.; ACS, G.; ACS, P.; PAUS, R.; BLUMBERG, P. M. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. **Blood**. 91(4):1332-40, 1998.

BLANK, M. L.; SNYDER, F.; BYERS, L. W.; BROOKS, B.; MUIRHEAD, E. E. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 90: 1194-200, 1979.

BORISH, L. C. and STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 111: S460-S475, 2003.

BOUSSO-MITTLER, D.; KLOOG, Y.; WOLLBERG, Z.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E.; SOKOLOVSKY, M. Functional endothelin/sarafotoxin receptors in the rat uterus. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, 162: 952-957, 1989.

BREDER, C. D. ; DEWITT, D. ; KRAIG, R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, 355: 296-315, 1995.

BREEN, E, C. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacol. & Therapeutics.**, 95:295-304, 2002.

CALIXO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation . **Pain**, 87: 1-5, 2000.

CALLARD, R. E.; MATHEUS, D. J.; HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one or same? **Immunol. Today**, 17: 108-110, 1996.

CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E. P.; CALIXO, J. B. Modulation of kinin B<sub>1</sub>- but not B<sub>2</sub>-receptors mediates rat paw edema by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Peptides**, 19: 1269-1276, 1998.

CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E. P.; CALIXO, J. B. In vivo B<sub>1</sub> kinin receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor  $\kappa$ B pathways. **Br. J. of Pharmacol.**, 127: 1851-1859., 1999.

CAMPOS, M. M.; DE SOUZA, G. E.; RICCI, N. D.; PESQUERO, J. L.; TEIXEIRA, M. M.; CALIXTO, J. B. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 135(5):1107-14, 2002.

CASSATELLA, M. A.; MEDA, L.; BONORA, S.; CESKA, M.; CONSTANTIN, G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human

polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, 178: 2207-2211, 1993.

CASEY, M. L.; WORD, R. A.; MACDONALD, P. C. Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. **J Biol Chem.**, 266: 5762-5767, 1991.

CARDUCCI, M. A.; NELSON, J. B.; BOWLING, M. K.; ROGERS, T.; EISENBERGER, M. A.; SINIBALDI, V.; DONEHOWER, R.; LEAHY, T. L.; CARR, R. A.; ISAACSON, J. D.; JANUS, T. J.; ANDRE, A.; HOSMANE, B. S.; PADLEY, R. J. Atrasentan, an endothelin receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. **J. Clin. Oncol.**, 20:2171–2180, 2002.

CARLTON, S. M.; COGGESHALL, R. E. **Brain Res.**, 763: 271–275, 1997.

CARR, D. B. and GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet. Rev.**, 12:2051-8, 1999.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389, 816–824, 1997.

CHAO, W. and OLSON, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. **Biochem. J. Rev.**, 292 :617-29, 1993.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol. Rev.**, 1(8):1397-406, 2001.

CORDER, R.; CARRIER, M.; KHAN, N.; VANE, J. R. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26: S56-S58, 1995.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European J. of Pharmacol.**, 429: 161-176, 2001.

CRANE, B. R.; ARVAI, A. S.; GACHHUI, R.; WU, C.; GHOSH, D. K.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D.J.; TAINER, J. A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science**, 278: 425-431, 1997.

CUNHA, J.M. et al. "Endotelinas induzem hiperalgesia através de receptores do tipo ET<sub>B</sub>". XXXIII **Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Caxambu**, 443P, 2001.

CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M.; McMILLEN, M.A. Endotoxin-stimulated monocytes produce endothelin. **FASEB J.**, 8: A214, 1991.

CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M.; McMILLEN, M.A. Endothelin-stimulated monocytes produce IL-1 $\beta$ , IL-8 and GM-CSF. **Mol. Biol. Cell**, 4: 415A, 1993.

DAHLOF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, D.; JERN, S.; HANSSON, L. Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. **J. Hypert.**, 8:811-817, 1990.

DAVAR, G.; HANS, G.; FAREED, M.U.; SINNOTT, C.; STRICHARTZ, G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **Neuroreport.**, 9: 2279-2283, 1998.

DAVIES, M. G.; KLYACHKIN, M. L.; KIM, J. H.; SVENDSEN, E.; HAGEN, P. O. Prolonged hypercholesterolemia induces reversible alterations in venous vasomotor function. **J. Invest. Surg.**, 8(1):43-55, 1995.

DE-MELO, J. D.; TONUSSI, C. R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; RAE, G. A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints of the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, 77:261-270, 1998.

DEMOPOULOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **J. Biol. Chem.**, 254: 9355-8, 1979.

DENAULT, J. B.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAWAMURA, T.; KILDO, T.; MASAKI, T.; LEDUC, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. **FEBS Lett.**, 362: 276-280, 1995.

DeNUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85(24): 9797-9800, 1988.

DOAK, G. J. and SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience.**, 80 (3): 939-949, 1997.

D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M.; YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET<sub>A</sub> receptors in the rat perfused lung. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 773-775, 1992.

DRAY, A.; BETTANEY, J.; FORSTER, P.; PERKINS, M. N. Activation of a bradikinin receptor in peripheral nerve and spinal cord in the neonatal rat in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 95:1008-1010, 1988.

DUPERRAY, A.; MANTOVANI, A.; INTRONA, M.; DEJANA, E. Endothelial cell regulation of leucocyte infiltration in inflammatory tissues. **Mediat. Inflamm.**, 4: 322-330, 1995.

EAKES, A. T.; HOWARD, K. M.; MILLER, J. E.; OLSON, M. S. Endothelin-1 production by hepatic endothelial cells: characterization and augmentation by endotoxin exposure. **Am. J. Physiol.**, 272:G605-G611, 1997.

EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E.; KEHRL, J.H. e FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **J. Exp. Med.**, 173: 1741-1748, 1990.

EHRENREICH, H.; BURD, p. r.; ROTTEM, M.; HÜLTNER, L.; HYLTON, J. B.; GARFIELD, M.; COLIGAN, J.E.; METCALFE, D. D.; FAUCI, A.S. Endothelins belong to the assortment fo mast cels-derived and mast cell-bound cytokines. **New. Biol.**, 4: 147-156, 1992.

EHRENREICH, H.; RIECKMANN, P.; SINOWATZ, F.; WEIH, K.A.; ARTHUR, L.O.; GOEBEL, F.D.; BURD, P.R.;COLIGAN, J.E.; CLOUSE, K.A. Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. **J. Immunol.**, 150 (10): 4601-4609, 1993.

ENDO, T.; UCHIDA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI, N.; NOMURA, A.; HIRATA, F. e HASEGAWA, S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 186: 1594-1599, 1992.

EHRLICH, P. **Arch. Mikr. Anat.**, 13: 263–277, 1878.

FABRÍCIO, A.S.C., SILVA, C.A.A., RAE, G.A., D'ORLÉANS-JUSTE, P. AND SOUZA., G.E.P. Essential role for endothelin ET<sub>B</sub> receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 125: 542-548, 1998.

FAREED, M. U.; HANS, G.; ATANDA, A.; STRICHARTZ, G.; DAVAR, G. Pharmacological characterization of acute pain behavior produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **J. Pain**, 1:46–53, 2000.  
Cell Mol Neurobiol 20:305–317.

GOTTWALD, T.; COERPER, S.; SCHAFFER, M.; KOVEKER, G.; STEAD, R. H. The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. **Wound Repair Regen.**, 6(1):8-20, 1998.

GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J. C.; BERGREEN, E. W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; MCMILLEN, M. A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**, 92:2551–2555, 1998.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; CALIXO, J. B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B<sub>1</sub> agonist des-Arg<sup>9</sup>-BK in rats pre-treated with LPS. **Regul. Pept.**, 89: 29-35, 2000.

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13: S220-S222, 1989.

FICKENSCHER, H; HÖR, S.; KÜPERS, H.; KNAPPE, A.; WITTMANN, S.; STICHT, H. The interleukin-10 family of cytokines. **Trends in immunol. Rev.**, 23 (2):89-96, 2002.

FIELDS, H. L.; EMSON, P. C.; LEIGH, B. K.; GILBERT, R. F.; IVERSEN, L. L. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. **Nature**. 284:351-3, 1980.

FILEP, J.G.; BATTISTINI, B., SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1633-1640, 1991.

FILEP, J.G.; FOURNIER, A.; FOLDES-FILEP, E. Endothelin-1-induced myocardial ischaemia and oedema in the rat: involvement the ET<sub>A</sub> receptor, platelet-activating factor and thromboxane A<sub>2</sub>. **Br. J.Pharmacol.**, 112(3): 963-971, 1994.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; GARRA, O' A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, 147: 3815-3822, 1991.

FLOWER, J. R. The development of COX 2 inhibitors. **Nat. Drug Discov. Rev.**, 2:179-181, 2003.

FU, J. Y.; MASFERRER, J. L. SEIBERT, K; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, 265: 16737-16740, 1990.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science Review.**, 294: 1871-1875.

GADINA, M; HILTON, D.; JOHNSTON, J. A.; MORINOBU, A; LIGHVANI, A.; ZHOU, Y. J.; VISCONTI, R.; O'SHEA, J. J. Signalling by type I and II cytokine receptors: ten years after. **Curr. Opin. Immunol.**, 13: 363-373, 2001.

GIAID, A.; GIBSON, S. J.; IBRAHIM, B. N.; LEGON, S.; BLONN, S. R.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; VARNDELL, I. M.; POLAK, J. M. Endothelin 1, an endothelium-derived

peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 86:7634-7638, 1989.

GILFOIL, T.M. and KLAVINS, I. 5-Hydroxytryptamine, bradykinin, and histamine as mediators of inflammatory hyperesthesia. **Am. J. Physiol.**, 208, 867– 876, 1965.

GECZY, C. Regulation and proinflammatory properties of the chemotactic protein, CP-10. **Biochim. Biophys. Acta**, 313:246-52, 1996.

GOKIN, A.P.; FAREED, M.U.; PAN, H.L.; HANS, G.; STRICHARTZ, G.R.; DAVAR, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. **J. Neurosci.**, 21(14): 5358-5366, 2001.

GONZALEZ, W.; CHEN, Z.; DAMON, D. H. Transforming growth factor-beta regulation of endothelin expression in rat vascular cell and organ cultures. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 2:219-26, 2001.

GOPPELT-STRUEBE, M.; WIEDEMANN, T.; HEUSINGER-RIBEIRO, J.; VUCADINOVIC, M.; REHM, M.; PROLS, F. Cox-2 and osteopontin in cocultured platelets and mesangial cells: role of glucocorticoids. **Kidney Int.**, 57(6):2229-38, 2000.

GRISWOLD, D. E.; DOUGLAS, S. A.; MARTIN, L. D.; DAVIS, T. G.; DAVIS, L.; AO, Z.; LUTTMANN, M. A.; PULLEN, M.; NAMBI, P.; HAY, D. W.; OHLSTEIN, E. H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Mol. Pharmacol.**, 56(4):807-812, 1999.

GUO, Y.; CERNACEK, P.; GIAID, A.; HUSSAIN, S. N. Production of endothelins by the ventilatory muscles in septic shock. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 19:470-476, 1998.

HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**. 31(3):251-8, 1992.

HALL, J. M. and MORTON, I. K. M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In the kinin system. **Farmer, S. G. Ed. Academic Press**, 9-43, 1997.

HAMMERMAN, S. I.; KOUREMBANAS, S.; CONCA, T. J.; TUCCI, M.; BRAUER, M.; FARBER, H. W. Endothelin-1 production during the acute chest syndrome in sickle cell disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 156:280–285, 1997.

HAO, J. X. and XU, X. J. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors. **Pain**. 66: 313-9, 1996.

HART, P. H.; VITTI, G. F.; BURGESS, D. R.; WHITTI, G. A.; PICCOLI, D. S.; HAMILTON, J. A. Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis  $\alpha$ , interleukin-1 and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 86: 3803-3807, 1989.

HAY, D.W.; LUTTMANN, M.A.; HUBBARD, W.C.; UNDEM, B.J. Endothelin receptor subtypes in human and guinea-pig pulmonary tissues. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1175-1183, 1993.

HAYNES, W.G. and WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? **Clinical Sci.**, 84: 485-500, 1993.

HELSET, E.; KJAEVE, J.; HAUGE, A. Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leukocytes and plasma. **Circ. Shock.**, 39: 15-20, 1993.

HINZ, B. and BRUNE, K. Cyclooxygenase 2-10 years later. **Journal of Pharmacol. and Experimental Ther.**, 300: 367-365, 2002.

HOURLANI, S. M. and CUSACK, N. J. Pharmacological receptors on bloods platelets. **Pharmac. Rev.**, 43: 243-298, 1991.

HUA, X. Y.; YAKSH, T. L. J. **Neurosci.**, 13: 1947-1953, 1993.

HUERRE, M. R. and GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res. Immunol.**, 147: 417-434, 1996.

HUNT, S. P. and MANTYH, P. The molecular dynamics of pain control. **Nature Rev. Neurosci.**, 2(2):83-91, 2001.

HURIBAL, M.; KUMAR, R.; CUNNINGHAM, M.; SUMPIO, B.E.; McMILLEN, M.A. Endothelin causes production of interleukin 6 but not interleukin 1 by human monocytes. **FASEB J.**, 6: A1613, 1992.

IHARA, M.; NOGUSHI, K.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; TSUSHIDA, S.; KIMURA, S.; FUKAMI, T.; ISHIKAWA, K.; NISHIKIBE, M.; YANO, M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET<sub>A</sub> receptor. **Life Sci.**, 50: 247-255, 1992.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAGUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptide predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 2863-2867, 1989.

INOUE T, MASHIMO T, SHIBUTA S, YOSHIYA I. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. **J. Neurol. Sci.**, 153(1): 1-7, 1997.

ISHIDA, K., TAKESHIGE, K., MINAKAMI, S., Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 496-500, 1990.

ISHII, S. and SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog. Lipid. Res.**, 39: 41-82, 2000.

ISHII, S.; NAGASE, T.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, 68-69:599-609, 2002.

ISHIZUKA T, TAKAMIZAWA-MATSUMOTO M, SUZUKI K, KURITA A Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. **Eur J Pharmacol.**, 19;369(2):237-45, 1999.

JARVIS, M.F.; WESSALE, J.L.; ZHU, C.Z.; LYNCHILL, J.J.; DAYTON, B.D.; CALZADILLA, S.V.; PADLEY, R.J.; OPGENORTH, T.J.; KOWALUK, E.A. ABT-627, an endothelin ET<sub>A</sub> receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. **Eur.J. Pharmacol.**, 388: 29-35, 2000.

JOHNSON, D. *et al.*, **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 50:227–234, 1991.

JULIUS, D. and BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature Rev.**, 413: 203-210, 2001.

KANSE, S.M.; TAKAHASHI, K.; LAM, H.C.; REES, A.; WARREN, J.B.; PORTA, M.; MOLINATTI, P.; GHATEI, M.; BLOOM, S.R. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. **Life Sci.**, 48(14): 1379-1384, 1991.

KATABAMI, T.; SHIMIZI, M.; OKANO, K.; YANO, Y., NEMOTO, K.; OGURA, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, S.; AHIRA, K.; YAMADA, Y. Intracellular signal transduction for interleukin-1 beta-induced endothelin production in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 188: 565-570, 1992.

KATORI, M. and MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. **Inflamm. Res.**, 49: 367-392, 2000.

KAR, S.; CHABOT, J. G.; QUIRION, R. Quantitative autoradiographic localisation of [125I]endothelin-1 binding sites in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. **Neurosci Lett.**, 133(1):117-20, 1991.

KARNE, S.; JAYAWICKREME, C.K.; LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, 268: 19126-19133, 1993.



KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, 344: 30-37, 2001.

KEDZIERSKI, R.M. and YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 41: 851-76, 2001.

KHODOROVA, A.; NAVARRO, B.; JOUAVILLE, L.S.; MURPHY, J.E.; RICE, F.L.; MAZURKIEWICZ, J.E.; LONG-WOODWARD, D.; STOFFEL, M.; STRICHARTZ, G.R.; YUKHANANOV, R.; DAVAR, G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med.**, 9:1055-1061, 2003.

KLEMM, P., WARNER, T.D., HOHLFELD, T., CORDER, R., VANE, J.R. Endothelin-1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous cytokine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 2691-2695, 1995.

KODA, W.; HARADA, K.; TSUNEYAMA, K.; KONO, N.; SASAKI, M.; MATSUI, O.; NAKANUMA, Y. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. **Lab. Invest.**, 80, 1007–1017, 2000.

KOHAN, D. E. Production of ET-1 by mesangial cells: Regulation by tumor necrosis factor. **J. Lab. Clin. Med.**, 119: 477-484, 1992.

KOMHOFF, M. ; GRONE, H. J. ; KLEIN, T. ; SEYBERTH, H. W. ; NUSING, R. M. Localisation of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. **Am. J. Physiol.**, 272:F460-8, 1997.

KOTENKO, S. V. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine & Growth Factor Rev.*, 13: 223-240., 2002.

KRAMER, B. K.; SMITH, T. W.; KELLY, R. A. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes: Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. **Circulation Res.**, 68: 269-279, 1990.

KUBES, P. and GRANGER, D. N. Leukocyte–endothelial cell interactions evoked by mast cells. **Cardiovasc Res.**, 32:699–708, 1996.

KUROSE, I.; MIURA, S.; FUKUMURA, D.; TSUCHIYA, M. Mechanisms of endothelin-induced macromolecular leakage in microvascular beds of rat mesentery. **Eur. J. Pharmacol.**, 250: 85-94, 1993.

LAMAS, S.; MITCHAEAL, T.; COLLINS, T., BRENNER, B. M.; MARSDEN, P. A. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, 90: 879-887, 1992.

LAVICK, T. R.; CORDEIRO, R. S. B.; CALIXTO, J. B. SILVA, P. M. R. MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European J. of Pharmacol.**, 462: 185-192, 2003.

LEES, D. M.; ZAKOS, P.; CORDER, R. The p55 tumor necrosis factor receptor (CD120a) induces endothelin-1 synthesis in endothelial and epithelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 390: 89-94, 2000.

LINCON, J.; HOYLE H. V. H.; BURNSTOCK, G. Nitric oxide in health and disease. **Cambridge Univ. Press.**, 1997.

LIU, Y.; YAMADA, H.; OCHI, J. Immunocytochemical studies on endothelin in mast cells and macrophages in the rat gastrointestinal tract. **Histochem. Cell Biol.**, 109, 301–307, 1998.

LOESER, J.D. and MELZACK, R. Pain: an overview. **The lancet.**, 353: 1607-1609, 1999.

MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by mu, delta and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 282: 977-84, 1997.

MACHELSKA H, PRZEWLOCKI R, RADOMSKI MW, PRZEWLOCKA B. Differential effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation. **Pol. J. Pharmacol.**, 50(6):407-15, 1998.

MACMAHON, B. MITCHEL, S.; BRADY, H. R.; GODSON, C. Lipoxins: revelations on resolutions. **Trends Pharmacol. Sci.**, 22: 391-395, 2001.

MAEMURA, K.; KURIHARA, H.; MORITA, T.; OH-HASHI, Y.; YAZAKI, Y. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factor associated with vascular injury. **Gerontology**, 38: 29-35, 1992.

MAJERUS, P. W. Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. **Curr. Biol.**, 29: R87-9, 1998.

MALING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. Jr. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48-80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 191: 300-10, 1974.

MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C. IPPONI, A.; BARTOLINI, A.; SCHNACK, W. Evidence for hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. **Life Sci.**, 63: 463-476, 1998.

MALMBERG, A. B and YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, 54(3): 291-300, 1993.

MARDSEN, P. A. and BRENNER, B. M. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. **Am. J. Physiol.**, 262: C854-C861, 1992.

MARGULIES, K. B.; HILDEBRAND, F. L. Jr ; LERMAN, A.; PERRELLA, M. A.; BURNETT, J. C. Jr. Increased endothelin-1 in experimental heart failure. **Circulation**, 82: 2226-30, 1990.

MASAKI, T.; VANE, J. R.; VANHOUTTE, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol. Rev.**, 46:137-142, 1994.

McCARRON, R.M., WANG, L., STANIMIROVIC, D.B., SPATZ, M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. **Neurosci. Lett.**, 156, 31-34, 1993.

MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. Pain mechanisms and management: a central perspective. **Clin J Pain. Rev.**, 16: S144-56, 2000.

MAURER, M.; THEOHARIDES, T.; GRANSTEIN, R. D.; BISCHOFF, S. C.; BIENENSTOCK, J.; HENZ, B.; KOVANEN, P.; PILIPONSKY, A. M.; KAMBE, N.; VLIAGOFTIS, H.; LEVI-SCHAFFER, F.; METZ, M.; MIYACHI, Y.; BEFUS, D.; FORSYTHE, P.; KITAMURA, Y.; GALLI, S. What is the physiological function of mast cells? **Exp. Dermatol.**, 12(6):886-910, 2003.

MAYER, B. and ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 358: 127-133, 1998.

MEKORI, Y. A. and METCALFE, D. D. Mast cell-T cell interactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 104, 517-523, 1999.

MELLER, S. T and GEBHART, G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain Rev.**, 52(2):127-36, 1993.

MENÉNDEZ, L.; LASTRA, A.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 36:28-34, 2002.

METZ, M. *et al.*, **J. Invest. Dermatol.**, 117: 439, 2001.

MYLECHARANE, E.J. The classification of 5-hydroxytryptamine receptors. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 16, 517- 522, 1989.

MILLAN, M.K. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, 57: 1-164, 1999.

MIYAUCHI, T. and MASAKI, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. **Annu. Rev. Physiol.**, 61: 391-415, 1999.

MIYAUCHI, T.; YANAGISAWA, M.; TOMIZAWA, T.; SUGISHITA, Y. e SUZUKI, N. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big-endothelin-1 in acute myocardial infarction. **Lancet**, 2: 53-54, 1989.

MOBARAKEH, J. I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMA, S.; KUTSUWA, M.; KURAMASU, A.; LIN, Z. Y.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, Y.; YANAI, K. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 391:81-9, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43 (2): 109-42, 1991.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFINAN, R. L.; GARRA, O' A. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, 19: 683-765, 2001.

MOORE, P. K.; OLUHOMI, A O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; HART, S. L. L-N<sup>G</sup>-Nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 198-202, 1992.

MOUSLI, M.; BUEB, J.L.; BRONNER, C.; ROUOT, B.; LANDRY, Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. **Trends Pharmacol. Sci.**, 11: 358–362, 1990.

NAKANO, J.; TAKIZAWA, H.; OHTOSHI, T.; SHOJI, S.; YAMAGUSHI, M.; ITO, K. Endotoxin and pro inflammatory cytokines stimulate endothelin-1 expression and release by airway epithelial cells. **Cin. Exp. Allergy**, 24: 330-336, 1994.

NATHAN, C and XIE QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell. Rev.**, 78(6):915-8, 1994.

NINOMIYA, H.; YU, X.Y.; HASEGAWA, S.; SPANNHAKE, E.W. Endothelin-1 induces stimulation of prostaglandin synthesis in cells obtained from canine airways by bronchoalveolar lavage. **Prostaglandins** 43: 401-411, 1992.

OHKUBO, T. *et al.*, **Eur. J. Pharmacol.**, 273: 83–88, 1995.

OHLSTEIN, E. H.; STORER, B. L.; BUTCHER, J. A.; DEBOUCK, C.; FEUERSTEIN, G. Platelets stimulate expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. **Circ. Res.**, 69: 832-841, 1991.

OLSEN, U. B.; ELTORP, C. T.; INGVARDBSEN, B. K.; JORGENSEN, T. K.; LUNDBAEK, J. A.; THOMSEN, C.; HANSEN, A. J. ReN 1869, a novel tricyclic antihistamine, is active against neurogenic pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 435: 43-57, 2002.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, 912(2):171-5, 2001.

OPAL, S. M. and DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Impact of Basic Res. On Tomorrows' Med.**, 117: 1162-1172, 2000.

OPGENORTH, T. J.; ADLER, A. L.; CALZADILLA, S. V.; CHIOU, W. J.; DAYTON, B. D.; DIXON, D. B.; GEHRKE, L. J.; HERNANDEZ, L.; MAGNUSON, S. R.; MARSH, K. C.; NOVOSAD, E. I.; VON GELDERN, T. W.; WESSALE, J. L.; WINN, M.; WU-WONG, J. R. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ET<sub>A</sub>-selective receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 276: 473-481, 1996.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

PACKARD, A. and KHAN, M. M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. **International Immunoph.**, 3: 909-9201, 2003.

PARADA, C.A.; TAMBELLI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. **Neurosci.**, 102: 937-9444, 2001.

PATALANO, F. and RUGGIERI, F. Sodium cromoglycate: a review. **Eur. Respir. J. Suppl.**, 6:556s–60s, 1989.

PAUS, R. *et al.*, **Arch. Dermatol. Res.**, 287: 500–502, 1995.

PIOVEZAN, A. P., D'ORLÉANS-JUSTE, P., TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 75, 596-600, 1997.

PIOVEZAN, A.P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 351: 15-22, 1998.

PIOVEZAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E.; RAE, G.A. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br. J. Pharmacol.**, 129(5):961-8, 2000.

PIOVEZAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; FRIGHETTO, M.; SOUZA, G. E.P; HENRIQUES, M. M. O.; RAE, G. A. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. **Br. J. Pharmacol.**, 141: 755-763, 2004.

POMONIS, J. D.; ROGERS, S. D.; PETERS, C. M.; GHILARDI, J. R.; MANTYH, P.W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci.**, 21(3):999-1006, 2001.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F.; CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 441:57-65, 2002.

PRODEUS, A. P.; ZHOU, X.; MAURER, M.; GALLI, S. J.; CARROLL, M. C. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. **Nature.**, 390: 172-175, 1997.

PRZEWLOCKA, B.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKI, R. Involvement of the nitric oxide pathway in nociceptive processes in the central nervous system in rats. **Regul. Pept.**, 1: S75-S76, 1994.

PRZEWLOCKI, R.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. **Life Sci.**, 53: PL1-5, 1993.

RAE, G. A. ; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Big-endothelin-1 contracts rat isolates uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ET<sub>A</sub> receptor-mediated mechanism. **Eur. J. Pharmacol.**, 240: 113-119, 1993.

RAE, G. A. ; CALIXTO, J. B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle of the respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts. **Reg. Pept.**, 55: 1-46, 1995.

RAE, G. A. and HENRIQUES, M. G. M. O. Endothelins in inflammation, In "Pro-inflammatory and anti-inflammatory peptides". **Ed. By S. Said. Marcel e Dekker, Inc., New York**, 1998.

RAFFA, R. B. and JACOBY, H. I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big- endothelin indirectly elicit a abdominal constriction response in mice. **Life Sci.**, 48: PL85-PL90, 1991.

RAFFA, R. B.; SCHUPSKY, J. J.; MARTINEZ, R. P. Endothelin-1 induced nociception. **Life Sci.**, 49: PL61-PL65, 1991.

RAFFA, R. B.; SCHUPSKI, J. J.; JACOBY, H. I. Endothelin-induced-nociception in mice: mediation by ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 276: 647-651, 1996a.

RAFFA, R.; SCHUPSKY, J.; LEE, D.; JACOBY, H. Characterization of endothelin-induced nociception in mice: evidence for a mechanistically distinct analgesic model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278:1–7, 1996b.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 36: 588-96, 2002.

RUBANYI, G. M. and POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathology. **Pharmacol. Rev.**, 45: 325-415, 1994.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, 348: 732-735, 1990.

SAMPAIO, A.L.; RAE, G.A.; D'ORLE´ANS-JUSTE, P.; HENRIQUES, M.G. ET<sub>A</sub> receptor antagonists inhibit allergic inflammation in the mouse. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26 (Suppl. 3), S416–S418, 1995.

SAMPAIO, A. L. ; RAE, G. A.; HENRIQUES, M. G. M. O. Pole of endothelins in lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. **J. Leukoc. Biol.**, 67(2): 189-195, 2000.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev.**, 177:195-203, 2000.

SHERRINGTON, C.S. The Integrative Action of the Nervous System. **Scribner**, New York, 1906.

SCHIFFRIN, E.L. Endothelin: role in experimental hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 35(4 Suppl 2): S33-35, 2000.

SCHOLZ, J. and WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Rev. Neurosci.**, 5: 1062-67, 2002.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; POLLARD, H.; RUAT, M., Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiol. Rev.**, 71: 1-51.

SCHUMAN, E. M. and MADISON, D. V. Nitric oxide and synaptic function. **Annu. Rev. Neurosci.**, 17:153-83, 1994.

SCHMITT, E.; HULS, C.; NAGEL, B.; RUDE, E. Characterization of a T-cell-derived mast cell costimulatory activity (MCA) that acts synergistically with interleukin 3 and interleukin 4 on the growth of murine mast cells. **Cytokine**, 2: 407–415, 1990.

SCIBERRAS, D. G.; GOLDENBERG, M. M.; BOLOGNESE, J. A.; JAMES, I.; BABER, N. S. Inflammatory responses to intradermal injection of platelet activating factor, histamine and prostaglandin E2 in healthy volunteers: a double blind investigation. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 24:753-61, 1987.

SHAPIRO, G. G. and KONIG, P. Cromolyn sodium: a review. **Pharmacotherapy**, 5:156–70, 1985.

SHIMADA, K.; YONETANI, Y.; KITA, T.; SUZUMURA, A.; TAKAYANAGI, T.; NAKASHIMA, T. Cyclooxygenase 2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, 356: 73-80, 1998.

SCHNEIDER, T. and ISSEKUTZ, A. C. Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. Application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. **J. Immunol. Meth.**, 198: 1-14. 1996.

SIEBECK, M.; SCHOOR, M.; SPANNAGI, E.; LEHNER, M.; FRITZ, H., CHERONIS, J. C.; WHALLEY, E. T. B<sub>1</sub> kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. **Immunopharmacol.**, 40: 49-55, 1998.

SIMONSON, M. S.; WANN, S.; MANE, P.; DUBYAK, G. R.; KESTER, M.; NAKAZATO, Y.; SEDOR, J. R.; DUNN, M.J. Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, *c-fos* expression, and mitogenesis in rat mesagial cells. **J. Clin. Invest.** 83: 708-712, 1989.

SIROIS, M.G.; FILEP, J.G.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; PLANTE, G.E.; SIROIS, P. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A<sub>2</sub>. **Eur. J. Pharmacol.**, 214, 119–125, 1992.

SOUSA, A. M. and PRADO, W. A. The dual effect of nitric oxide donor in nociception. **Brain. Res.**, 897: 9-19, 2001.

SOUZA, D. G.; COUTINHO, S. F.; SILVEIRA, M. R.; CARA, D. C.; TEIXEIRA, M. M. Treatment with a leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist inhibits local and remote reperfusion injury after transient ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 403: 121-314, 2000.

STANKOVA, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Endothelin-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. **Am.J. Physiol.**, 271: C1073-C1078, 1996.



STUEHR, D. J. and MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 82(22):7738-42, 1985.

STUEHR, D. J and MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon-gamma. **J. Immunol.**, 139 (2): 518-25, 1987.

SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 41: 53-6, 1992.

STEINHOFF, M. *et al.*, **Nat. Med.**, 6: 151–158, 2000.

SUGIURA, M., INAGAMI, T., KON, V. Endotoxin stimulated endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 161,1220-1227, 1989.

SUGIURA, H. *et al.*, **Acta Derm. Venereol.** (Stockh), 176:74–76, 1992.

TEIXEIRA, M. M. and HELLEWELL, P.G. The effect of the selectin binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, 120: 1059-1066, 1997.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; PONS, F.; CHABRIER, P.E.; MENCIA-HUERTA, J.M. e BRAQUET, P. Bronchopulmonary and vascular effect of endothelin in the guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, 176(1):23-33, 1990.

UCHIDA, Y.; NINOMIYA, H.; SAKAMOTO, T.; LEE, J.Y.; ENDO, T.; NOMURA, A.; HASEGAWA, S.; HIRATA, F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, 189: 1196–1201, 1992.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New. Biol.**, 231(25): 232-5, 1971.

VANE, J. R. and BOTTING, R. M. Mechanism of Action of Anti-inflammatory Drugs. **Scand J. Rheumatol. Suppl.**, 102: 9-21, 1996.

VANE, J. R. and BOTTING, R. M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, 38: 97-120, 1998.

VEMULAPALLI, S., CHIU, P.J., GRISCTI, K., BROWN, A., KUROWSKI, S., SYBERTZ, E.J. Phosphoramidon does not inhibit endogenous endothelin-1 release stimulated by hemorrhage, cytokines and hypoxia in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 257, 95-102,1994.

VIGNE, P.; LADOUX, A. e FRELIN, C. Endothelins activate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. **J. Biol. Chem.**, 266: 5925-5928, 1991.

WACNIK, P.W.; EIKMEIER, L.J.; RUGGLES, T.R.; RAMNARAIN, M.L.; WALCHECK, B.K.; BEITZ, A.J.; WILCOX, G.L. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. **J. Neurosci.**, 21, 9355-9366, 2001.

WALZOG, B. and GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News Physiol Sci.**; (15):107-113, 2000.

WEBB, M.L. and MEEK, T.D. Inhibitors of endothelin. **Med. Res. Rev.**, 17: 17-67, 1997.

WELLING, M. M.; HIEMSTRA, P. S.; VAN DEN BARSELAAR, M. T.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; NIBBERING, P. H.; PAUWELS, E. K.; CALAME, W. Antibacterial activity of human neutrophil defensins in experimental infections in mice is accompanied by increased leukocyte accumulation. **J. Clin. Invest.**, 102:1583-90, 1998.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; GABLER, C.; KILLIAN, G.; MIYAMOTO, A.. 2003 Tumor necrosis factor alpha in the bovine oviduct during the estrous cycle: messenger RNA expression and effect on secretion of prostaglandins, endothelin-1, and angiotensin II. **Biol. Reprod.**, 69(4):1341-6, 2003.

WILSON, S. H.; SIMARI, R. D.; LERMAN, A. The Effect of Endothelin-1 on Nuclear Factor Kappa B in Macrophages. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, 286: 968-972, 2001.

XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L.; SIMMONS, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 2692-2696, 1991.

YANG, Z.; TAO, T.; RAFTERY, M. J.; YOUSSEF, P.; DI GIROLAMO, N.; GECZY, C. L. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. **J. Leukoc. Biol.**, 69:986-94, 2001.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S.; OHATA, K. Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C4 from mouse bone-marrow-derived mast cells. **Eur.J. Pharmacol.**, 257: 235-242, 1994.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S. e OHATA, K. Mechanism of histamine release by endothelin 1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow derived mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 188: 268-275, 1995.

YAMAGATA, K; ANDREASSON, K. I.; KAUFMANN, W. E. ; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron.**, 11: 371-86, 1993.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332: 441-445, 1988.

YOSHIZUMI, M.; KURIHARA, H.; MORITA, T.; YMASHITA, T.; OH-HASHI, Y.; TAKAKU, F.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; YASAKI, Y. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 166: 324-329, 1999.

ZOUKI, C.; BARON, C.; FOURNIER, A.; FILEP, J. G. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. **Br J Pharmacol.**, 127(4):969-79, 1999.

ZUO, Y; PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J.; GECZY, C. L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, 105: 467-479, 2003.